

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 2002-202307

(43)Date of publication of application : 19.07.2002

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

(21)Application number : 2000-399268

(71)Applicant : LATRON LAB INC

(22)Date of filing : 27.12.2000

(72)Inventor : MATSUURA SHIRO  
BEPPU YOSHINORI**(54) IMMUNOCHROMATOGRAPHY****(57)Abstract:****PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide rapid and simple immunochromatography having sensitivity further higher than that of conventional known immunochromatography.**SOLUTION:** In the immunochromatography utilizing the immunoreaction due to an object to be analyzed and an antibody or antigen specifically bonded thereto and analyzing the signal of a label resulting from an immobilized immune complex, metal ions and a reducing agent are brought into contact with the label selected from the group consisting a metal colloid label and a metal sulfide label and metal particles generated by reducing metal ions by the reducing agent are deposited on the label and the deposit on the immobilized immune complex is analyzed.**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

**BEST AVAILABLE COPY**

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**\* NOTICES \***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] In the immuno chromatography which analyzes the signal of the indicator which uses the immunoreaction by the antibody or antigen specifically combined with an analysis object and it, and originates in the fixed immune complex A metal ion and a reducing agent are contacted on the indicator chosen from the group which consists of a metal colloid indicator and a metallic sulfide indicator. Said immuno chromatography which is made to carry out the deposition of the metal particles produced by reduction of said metal ion by said reducing agent to said indicator, and is characterized by analyzing said precipitate on said fixed immune complex.

---

[Translation done.]

### \* NOTICES \*

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to new immuno chromatography. According to the immuno chromatography of this invention, after catching at the same time it catches the analysis object in a specimen immunologically or, an analysis object can be analyzed to high sensitivity. "Detection" which judges the existence of the existence of the quality of an analysis object, and "measurement" which determines the amount of the quality of an analysis object quantitatively or in half-quantum are included in "analysis" in this specification.

[0002]

[Description of the Prior Art] There is very much what acts with ultralow volume in physiological active substances, such as a natural product, a toxin, hormone, or agricultural chemicals, or an environmental pollutant. Therefore, the instrumental-analysis method with these qualitative and matter in which former and high sensitivity analysis is possible to quantitative measurement has been used widely. However, its singularity is low, and when analysis takes time amount including the head end process of a sample, since an instrumental-analysis method has complicated actuation, it is inconvenient for the quick simple measurement purpose demanded in recent years. On the other hand, since singularity is also high and actuation is also far simpler than instrumental analysis, immunoassay has spread through the measurement field of a physiological active substance or an environmental pollutant gradually. However, conventional immunoassay like the enzyme immunoassay using 96 hole plate or a latex condensation method was not necessarily what fills the quick simple nature or detection sensitivity of measurement.

[0003] Since it was used for the immunological test kit for pregnancy which makes the human chorionic gonadotropin an index in recent years, immuno chromatography is in the immunoassay which is in the limelight as an approach of filling the quick simple nature of measurement. for example, in the immuno chromatography using a sandwich technique The 2nd antibody of labeling specifically combined with an analysis object in the insoluble thin film-like base materials (for example, the glass fiber film, the nylon film, or a cellulose wall etc.) which fixed to the specific field the 1st antibody specifically combined with an

analysis object (for example, antigen), The specimen solution which may include an analysis object is developed, on the field which fixed the 1st antibody of an insoluble thin film-like base material, an immune complex with an analysis object can be made to be able to form, signals, such as coloring of an indicator or coloring, can be detected, and an analysis object can be measured. In addition, as said indicator, the protein containing an enzyme, a coloring latex particle, metal colloid, or a carbon particle can be used, for example. After the specimen solution which may include an analysis object is dropped, when it is the quick and simple approach by which a measurement result is obtained only by putting for about 5 - 10 minutes, this immuno chromatography is high sensitivity, so that the detection sensitivity of an analysis object is also equal to enzyme immunoassay.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, a physiological active substance or environmental pollutants, such as the aforementioned natural product, a toxin, hormone, or agricultural chemicals, have much matter which acts with ultralow volume undetectable by the conventional detecting method in such immuno chromatography, and its development of those quickness, simplicity, and the method of detecting high sensitivity is indispensable. The technique which devised the means of expansion conventionally (JP,1-32169,A and JP,4-299262,A), The technique which devised the coloring particle (JP,5-10950,A and JP,5-133956,A), The technique (JP,7-318560,A) which devised the expansion member, the technique using avidin-biotin association (JP,10-68730,A), And the actual condition is that techniques which can still be satisfied although many amelioration techniques which aimed at high sensitivity-ization are indicated, such as a technique (JP,11-69996,A) using enzyme immunoassay, are not offered. Therefore, the technical problem of this invention is to offer immuno chromatography [ still high sensitivity / chromatography / simple / quick and / and well-known moreover conventionally / immuno ].

[0005]

[Means for Solving the Problem] In the immuno chromatography which analyzes the signal of the indicator which the immunoreaction by the antibody or antigen specifically combined with the analysis object and it by this invention is used for said technical problem, and originates in the fixed immune complex A metal ion and a reducing agent are contacted on the indicator chosen from the group which consists of a metal colloid indicator and a metallic sulfide indicator. It is solvable with said immuno chromatography which is made to carry out the deposition of the metal particles produced by reduction of said metal ion by said reducing agent to said indicator, and is characterized by analyzing said precipitate on said fixed immune complex.

[0006] In this specification, although especially "immuno chromatography" is not limited, it can mention the immunological analysis method enforced, for example while developing a part of 1 or two or more antigen-antibody reactions [ at least ] on the thin film-like base material for chromatographs including the process using chromatography (especially thin-layer chromatography or paper chromatography) in process. In addition, in this specification, a "thin film-like base material" means the thin layer which the stationary phase was meant [ thin layer ], for example, made the support plate (for example, a glass plate, an aluminum plate, or a plastic sheet) fix in thin-layer chromatography, and means a filter paper by paper chromatography.

[0007]

[Embodiment of the Invention] The immune complex which contains an analysis object, a fixed antibody or an antigen, and an indicator at least is made to form in immuno chromatography generally on an insoluble thin film-like base material (or inside of said base material), and the signal of the indicator originating in the immune complex is analyzed. the immuno chromatography using a metal colloid indicator or a metallic sulfide indicator (hereafter, a metal colloid indicator and a metallic sulfide indicator may be combined, and a metal system indicator may be called) as an indicator according to this invention approach -- setting -- the signal of said metal system indicator -- magnification -- or sensitization can be carried out. Since set like the formation fault of said immune complex, or a reducing agent and a metal ion are contacted after formation of said immune complex, the metal particles will specifically use said metal system indicator as a nucleus if a metal ion is returned and metal particles are made to generate with a reducing agent, and deposition is carried out on said metal system indicator, said metal system indicator is amplified and an analysis object can be analyzed to high sensitivity. Therefore, the immuno chromatography of this invention carries out the reaction which carries out deposition to the indicator of an immune complex using the metal particles produced according to a reduction operation of the metal ion by the reducing agent, and if it removes analyzing the signal amplified in this way, it can apply well-known immuno chromatography as it is conventionally at the other point.

[0008] As immuno chromatography of this invention, various methods exist according to the existence of use of the operation sequence of an antigen-antibody reaction, the object compound which fixes and labels, and a reference compound, the number of the antibodies used for a list, etc. In addition, in this specification, a "reference compound" means the compound equivalent to the compound for analysis. For example, when analyzing the lactoferrin in a specimen, commercial lactoferrin can be used, and when analyzing the Okada acid in a specimen, the commercial Okada acid can be used.

[0009] As a concrete mode of the immuno chromatography by this invention, it is the process contacted while developing the specimen which may include (1) analysis object (antigen), and the reference compound (a labeling reference compound is called hereafter) of the known amount which has an indicator, for example.;

(2) Process contacted while having singularity to said analysis object after termination of said process (1) and coincidence, or said process (1) and making the antibody made to fix on a suitable insoluble thin film-like base material develop said labeling reference compound;

(3) process; which separates the labeling reference compound combined with said fixed antibody, and the labeling reference compound which has not been combined with said fixed antibody, and (4) -- can make said indicator able to carry out the deposition of the metal particles produced by reduction of said metal ion by said reducing agent, and immuno chromatography including the process which analyzes said produced precipitate can mention by contacting a metal ion and a reducing agent to the indicator of the labeling reference compound which combined with said fixed antibody.

This approach usually applies the immuno chromatography of this invention to the approach called the antibody fixation-ized competing method (the direct competing method and the indirect competing method are included). In addition, although said mode is a mode in which a metal ion and a reducing agent are contacted in said process (4), it can also contact a metal ion and a reducing agent in said process (1) - (3) in the immuno chromatography of this invention.

[0010] Moreover, as another concrete mode of the immuno chromatography by this invention, it is the process contacted before expansion while having singularity to (1) analysis object (antigen) and developing the antibody (a labeling antibody is called hereafter) of the known amount which has an indicator, and the specimen which may include an analysis object, for example.;

(2) Process contacted while making the reference compound (a fixed reference compound is called hereafter) of the known amount made to fix on a suitable insoluble thin film-like base material after termination of said process (1) and coincidence, or said process (1) develop said labeling antibody;

(3) Can make said indicator able to carry out the deposition of the metal particles produced by reduction of said metal ion by said reducing agent, and immuno chromatography including the process which analyzes said produced precipitate can mention to the indicator of the labeling antibody combined with process; which separates the labeling antibody combined with said fixed reference compound, and the antibody which has not been combined with said fixed reference compound, and (4) fixed reference compound by contacting a metal ion and a reducing agent.

This approach also usually applies the immuno chromatography of this invention to the approach called the antigen fixed competing method (the direct competing method and the indirect competing method are included). In addition, although said mode is a mode in which a metal ion and a reducing agent are contacted in said process (4), it can also contact a metal ion and a reducing agent in said process (1) - (3) in the immuno chromatography of this invention.

[0011] As still more nearly another concrete mode of the immuno chromatography by this invention, it is the process which makes the 1st antibody which has singularity to (1) analysis object (antigen) fix on a suitable insoluble thin film-like base material, for example.;

(2) Process which contacts the specimen which may include said analysis object to said 1st antibody of immobilization;

About the 2nd antibody which has an indicator while combining said 1st antibody by different part to said analysis object, it is an excessive amount. From said process (2) before (3) To coincidence Or by contacting a metal ion and a reducing agent on the indicator on the 2nd antibody combined with the immune complex of process; contacted after termination and the 1st antibody of (4) immobilization, and an analysis object The deposition of the metal particles produced by reduction of said metal ion by said reducing agent can be carried out to said indicator, and immuno chromatography including the process which analyzes said produced precipitate can be mentioned.

This approach usually applies the immuno chromatography of this invention to the approach called the sandwiching method. In addition, although said mode is a mode in which a metal ion and a reducing agent are contacted in said process (4), it can also contact a metal ion and a reducing agent in said process (3) in the immuno chromatography of this invention.

[0012] As still more nearly another concrete mode of the immuno chromatography by this invention, it is the process which makes the antigen specifically combined to (1) analysis object (antibody) fix on a suitable insoluble thin film-like base material, for example;

(2) Process which contacts the specimen which may include said analysis object to said fixed antigen; The 2nd antibody which has an indicator while having singularity to said analysis object from said process (2) with an excessive amount before (3) To coincidence Or by contacting a metal ion and a reducing agent on the indicator on the 2nd antibody combined with the immune complex of process; contacted after termination and (4) fixed antigen, and an analysis object The deposition of the metal particles produced by reduction of said metal ion by said reducing agent can be carried out to said indicator, and immuno chromatography including the process which analyzes said produced precipitate can be mentioned. This approach usually applies the immuno chromatography of this invention to the approach called a fixed antigen method. In addition, although said mode is a mode in which a metal ion and a reducing agent are contacted in said process (4), it can also contact a metal ion and a reducing agent in said process (3) in the immuno chromatography of this invention. Moreover, in addition to this, this invention is widely applicable to well-known immuno chromatography.

[0013] In the immuno chromatography of this invention, a metal colloid indicator or a metallic sulfide indicator is used as an indicator which uses the antibody specifically combined with an analysis object (an antigen or antibody), an antigen, or a reference compound for carrying out an indicator. As long as it is the indicator which can be used for the usual immuno chromatography as said metal colloid indicator or a metallic sulfide indicator, it is not limited, and as a metal colloid indicator, platinum colloid, gold colloid, or silver colloid can be mentioned, and each sulfide of iron, silver, lead, copper, cadmium, a bismuth, antimony, tin, or mercury can be mentioned as a metallic sulfide indicator, for example. In the immuno chromatography of this invention, more than 1 or it of these metal colloid indicators and/or a metallic sulfide indicator can be used as an indicator.

[0014] In the immuno chromatography of this invention, although it is not limited as long as the metal particles produced by reduction are the metal ions which can carry out the deposition of the indicator as a nucleus as a metal ion which can be used for signal magnification of an indicator especially, complex ion, platinum ion, or golden ion can be mentioned, for example. With the immuno chromatography of this invention, a silver nitrate, silver acetate, or silver lactate can be used as said complex ion by the shape of liquefied (for example, the water solution or aqueous organic solution of complex ion), or a solid-state, for example.

[0015] In the immuno chromatography of this invention, although it is not limited as long as it is the possible reducing agent of returning said metal ion and generating metal particles as a reducing agent which can be used for signal magnification of an indicator especially, hydroquinone or its derivative (for example, BUROMO hydroquinone) can be mentioned, for example.

[0016] In the immuno chromatography of this invention, the metal particles produced by reduction of the metal ion by the reducing agent carry out signal magnification of an indicator by using the reaction which carries out the deposition of said metal colloid indicator or the metallic sulfide indicator as a nucleus. In addition, the approach of approach [, for example, Danscher, and Norgaard that it is well-known in itself [ said / reaction ] (J. Histochem.Cytochem., 31, 1394, 1983), Holgate's and others approach (J. Histochem.Cytochem., 31, 938, 1983), Fujimori's and others approach (Arch.Histol.Jap., 48, 449, 1985), The approach of Nakamura and others (Histochemal.J., 17, 47, 1985), The approach of Danscher (Histochemistry, 71, 1, 1981), Skutelsky's and others approach (Histochemistry., 86, 291, 1987), Hacker's and others approach (J. Histotechnology, 11, 213, 1988), They are the approach (Histochemistry, 82, 321, 1985) of Scopsi and Larsson, and approach [ of Moeremans and others ] (J. Immunol.Methods, 74, 353, 1983)].

[0017] Although not limited especially in the immuno chromatography of this invention, for example in the pH regulator (for example, citrate buffer solution, the acetic-acid buffer solution, or the lactic-acid buffer solution) of pH 3-4 the bottom of coexistence of protective colloid (for example, gum arabic), or un-living together -- metal ion [-- especially complex ion (for example, the reducing agent of silver-nitrate, silver

acetate, or silver lactate] --) The deposition of the indicator on said immune complex can be carried out for the metal particles (for example, silver granule child) produced in the reduction operation by for example, (hydroquinone or BUROMO hydroquinone) as a nucleus, and the precipitate on said immune complex can be analyzed.

[0018] Especially analytical method of said precipitate can be enforced viewing or by analyzing the reflected light with suitable measuring devices (for example, a reflected light measuring device or a scanner etc.), for example, although not limited.

[0019] In the immuno chromatography of this invention, although not limited, after especially the concrete mode of an approach in which an indicator, a metal ion, and a reducing agent are contacted develops a specimen, to the indicator on an immune complex, it can also add the solution containing both a metal ion and a reducing agent, or can also add a metal ion solution and a reducing-agent solution in coincidence or order, for example. Or the solution containing a labeling reference compound, a labeling antibody, the 2nd antibody of labeling, or a specimen can also be made to develop a metal ion and a reducing agent to coincidence on a thin film-like base material using the solution added further beforehand. Furthermore, after developing a specimen, the solution containing a metal ion and a reducing agent can also be developed.

[0020] As long as it is the sample which may include an analysis object as a specimen which can be analyzed with the immuno chromatography of this invention, it is not limited and those body fluid [ of a biological sample, especially an animal (especially Homo sapiens) ] (for example, blood, blood serum, plasma, cerebrospinal fluid, tear fluid, sweat, urine, pus, or expectoration) or excrement (for example, feces), organ, organization, animals-and-plants itself, or desiccation object can be mentioned.

[0021] With the immuno chromatography of this invention, said specimen is remained as it is, or it is the form of the extract which extracts said specimen using the suitable solvent for an extract, and is obtained, and said extract can be further used in the form of the diluent diluted and obtained by the suitable diluent. As said solvent for an extract, the solvents (for example, water, a physiological salt solution, or the buffer solution etc.) used with the usual immunological analysis method or the water miscibility organic solvent which can carry out a direct antigen-antibody reaction by diluting with said solvent can also be used, and the mixture of an organic solvent and water is desirable. As said water miscibility organic solvent, an alcoholic compound (for example, lower alcohol [ of 1-3 carbon atoms ]; especially methyl alcohol, ethyl alcohol, n-propyl alcohol, or isopropyl alcohol), a ketone compound (for example, low-grade aliphatic series ketone [ of 2-4 carbon atoms ]; especially a methyl ethyl ketone or an acetone), N.N-dimethylformamide, dioxanes, or such mixture can be mentioned, and it can choose suitably according to the class of analysis object, for example.

[0022] In the immuno chromatography of this invention The antibody which has singularity to an analysis object (by the sandwiching method) Although an antigenic determinant is not especially limited as the 1st mutually different antibody and the 2nd antibody For example, the antiserum prepared from the blood serum of the animal by which immunity was carried out with the analysis object, antiserum -- from -- refining -- having had -- an immunoglobulin -- a fraction -- the -- analysis -- an object -- immunity -- carrying out -- having had -- an animal -- a spleen cell -- using -- cell fusion -- obtaining -- having -- a monoclonal antibody -- or -- those -- a fragment -- [-- for example, -- F (ab') -- two -- Fab -- Fab -- ' -- or -- Fv --] -- it can use . Preparation of these antibodies can be performed with a conventional method.

[0023] As long as it is the wafer for immuno chromatographs which can be used for the usual immuno chromatography as a wafer for immuno chromatographs which can be used for the immuno chromatography of this invention, it is not limited and the wafer for immuno chromatographs typically shown in drawing 1 can be used. As for the wafer 10 for immuno chromatographs shown in drawing 1 , the sample addition pad 1, the labeling matter maintenance pad 2, the fixed membrane 3, and the absorption pad 4 are arranged on the pressure sensitive adhesive sheet 5 toward the lower stream of a river at this order from the upstream of the expansion direction (direction shown by the arrow head A in drawing 1 ).

[0024] Said fixed membrane 3 has detection zone 3a which is the field which fixed the antibody or antigen specifically combined with an analysis object, and has further control zone 3b which is the field which fixed the antibody for control, or the antigen by request. Said labeling matter maintenance pad 2 can be prepared by drying it, after preparing the suspension containing the labeling matter and applying the suspension to a suitable absorption pad. Moreover, said sample addition pad 1 can dip a suitable base material (for example, glass fiber putt) in a suitable solution (for example, water solution which contains cane sugar, 0.2%Tween20, and 0.1% poly vinyl alcohol 0.5%), and can prepare it by drying, for example.

[0025] Hereafter, the immuno chromatography of this invention is explained in order based on each mode applied to the antibody fixation-ized competing method (the antibody fixation-ized direct competing method and the antibody fixation-ized indirect competing method are included) which is the concrete embodiment, the antigen fixed competing method (the antigen fixed direct competing method and the antigen fixed indirect competing method are included), the sandwiching method, and the fixed antigen method, respectively.

[0026] Especially in the mode (the antibody fixation-ized competing method is only called hereafter) which applied the immuno chromatography of this invention to the antibody fixation-ized competing method, although not limited, the following procedures can analyze an analysis object, for example. First, the antibody which has singularity to an analysis object (antigen) is beforehand prepared by the approach described previously, and the antibody is fixed on suitable insoluble thin film-like base materials (for example, the glass fiber film, the nylon film, or a cellulose wall etc.). Moreover, the reference compound is beforehand labeled using the metal colloid indicator or the metallic sulfide indicator. it contacts developing the specimen (or the extract) which may include an analysis object (antigen), and said labeling reference compound -- making -- it -- simultaneously -- or if it is made to contact, making said fixed antibody develop said labeling reference compound after the termination, when an analysis object exists in the specimen, an antigen-antibody reaction occurs. This antigen-antibody reaction can be performed like the usual antigen-antibody reaction.

[0027] After contacting a specimen and the labeling reference compound (namely, labeling antigen) of a known amount, said fixed antibody is made to contact by the antibody fixation-ized indirect competing method. Therefore, the fixed antibody which has not been combined with the analysis object originating in a specimen combines with a labeling reference compound. On the other hand, by the antibody fixation-ized direct competing method, contact and coincidence of a specimen and the labeling reference compound (namely, labeling antigen) of a known amount are contacted to said fixed antibody. Therefore, the labeling reference compound of a known amount and the analysis object of the unknown originating in a specimen combine with a fixed antibody in antagonism.

[0028] By the antibody fixation-ized competing method (the antibody fixation-ized direct competing method and the antibody fixation-ized indirect competing method are included) The labeling reference compound combined with the fixed antibody on said insoluble thin film-like base material, and the fixed antibody after a reaction with a labeling reference compound (namely, labeling antigen) is completed, The signal from the indicator of the labeling antigen combined with the fixed antibody is amplified by dropping a metal ion and a reducing agent at the field which separated the labeling reference compound which was not combined with a fixed antibody, then fixed the fixed antibody for example, in an insoluble thin film-like base material. Or the signal from the indicator of the labeling reference compound combined with the fixed antibody is amplified by adding a metal ion and a reducing agent to a labeling reference compound, and adding to a thin film-like base material at coincidence. Washing by the buffer solution can perform said separation.

[0029] Especially in the mode (the antigen fixed competing method is only called hereafter) which applied the immuno chromatography of this invention to the antigen fixed competing method, although not limited, the following procedures can analyze an analysis object, for example. First, the antibody which has singularity to an analysis object (antigen) is beforehand prepared by the approach described previously. Moreover, said antibody is beforehand labeled using the metal colloid indicator or the metallic sulfide indicator. Furthermore, the reference compound (antigen) of a known amount is fixed on suitable insoluble thin film-like base materials (for example, the glass fiber film, the nylon film, or a cellulose wall etc.).

[0030] After the contact process of said labeling antibody of a known amount and the specimen (or the extract) which may include an analysis object (antigen) is completed, the fixed reference compound (antigen) of a known amount is made to contact further by the antigen fixed indirect competing method. Therefore, the labeling antibody which has not been combined with the analysis object originating in a specimen combines with the fixed reference compound of the known amount of an insoluble thin film-like base material. On the other hand, by the antigen fixed direct competing method, the contact process and coincidence with a specimen (or the extract) which may include said labeling antibody and analysis object (antigen) of a known amount are contacted with the fixed reference compound (antigen) of a known amount. Therefore, the analysis object of the unknown originating in a specimen and the fixed reference compound of the known amount of an insoluble thin film-like base material combine with the labeling antibody of a known amount in antagonism.



[0031] By the antigen fixed competing method (the antigen fixed direct competing method and the antigen fixed indirect competing method are included) The fixed reference compound on said insoluble thin film-like base material (namely, fixed antigen), The labeling antibody combined with the fixed reference compound after the reaction with a labeling antibody was completed, The signal from the indicator of the labeling antibody combined with the fixed reference compound is amplified by dropping a metal ion and a reducing agent at the field which separated the labeling antibody which was not combined with a fixed reference compound, then fixed the fixed reference compound for example, in an insoluble thin film-like base material. Or the signal from the indicator of the labeling antibody combined with the fixed reference compound is amplified by adding a metal ion and a reducing agent to a labeling antibody, and adding to a thin film-like base material at coincidence. Washing by the buffer solution can perform said separation.

[0032] Especially in the mode (the sandwiching method is only called hereafter) which applied the immuno chromatography of this invention to the sandwiching method, although not limited, the following procedures can analyze an analysis object, for example. First, the 1st antibody and the 2nd antibody which have singularity to an analysis object (antigen) are beforehand prepared by the approach described previously. Moreover, the 2nd antibody is beforehand labeled using the metal colloid indicator or the metallic sulfide indicator. The 1st antibody is fixed on suitable insoluble thin film-like base materials (for example, the glass fiber film, the nylon film, or a cellulose wall etc.), and if the specimen (or the extract) which may include an analysis object (antigen) is made to contact, when an analysis object exists in the specimen, an antigen-antibody reaction occurs. This antigen-antibody reaction can be performed like the usual antigen-antibody reaction. If the 2nd antibody of labeling of an excessive amount is further contacted after said antigen-antibody reaction and coincidence, or a reaction, when an analysis object exists in a specimen, the immune complex which consists of the 1st antibody of immobilization, an analysis object (antigen), and the 2nd antibody of labeling is formed.

[0033] By the sandwiching method, after the reaction of the 1st antibody of immobilization, an analysis object (antigen), and the 2nd antibody is completed, the signal from the indicator of the 2nd antibody of labeling which formed said immune complex in the field which removed the 2nd antibody of labeling which did not form said immune complex, then fixed the 1st antibody of immobilization for example, in an insoluble thin film-like base material by dropping a metal ion and a reducing agent is amplified. Or the signal from the indicator of the 2nd antibody of labeling in which said immune complex was formed is amplified by adding a metal ion and a reducing agent to the 2nd antibody of labeling, and adding to a thin film-like base material at coincidence.

[0034] Especially in the mode (a fixed antigen method is only called hereafter) which applied the immuno chromatography of this invention to the fixed antigen method, although not limited, the following procedures can analyze an analysis object, for example. First, the 2nd antibody which has singularity to an analysis object (antibody) is beforehand prepared by the approach described previously. Moreover, said 2nd antibody is beforehand labeled using the metal colloid indicator or the metallic sulfide indicator. The antigen which an analysis object (antibody) combines specifically is fixed on suitable insoluble thin film-like base materials (for example, the glass fiber film, the nylon film, or a cellulose wall etc.), and if the specimen (or the extract) which may include an analysis object (antibody) is made to contact, when an analysis object exists in the specimen, an antigen-antibody reaction occurs. This antigen-antibody reaction can be performed like the usual antigen-antibody reaction. If the 2nd antibody of labeling of an excessive amount is further contacted after said antigen-antibody reaction and coincidence, or a reaction, when an analysis object exists in a specimen, the immune complex which consists of a fixed antigen, an analysis object (antibody), and the 2nd antibody of labeling is formed.

[0035] By the fixed antigen method, after the reaction of a fixed antigen, an analysis object (antibody), and the 2nd antibody is completed, the signal from the indicator of the 2nd antibody of labeling which formed said immune complex in the field which removed the 2nd antibody of labeling which did not form said immune complex, then fixed the fixed antigen for example, in an insoluble thin film-like base material by dropping a metal ion and a reducing agent is amplified. Or the signal from the indicator of the 2nd antibody of labeling in which said immune complex was formed is amplified by adding a metal ion and a reducing agent to the 2nd antibody of labeling, and adding to a thin film-like base material at coincidence.

[0036]

[Example] Hereafter, although an example explains this invention concretely, these do not limit the range of this invention.



[Example 1] Silver sensitization [ of <<gold colloid labelled antibody >> ]

(1) The membrane made from production Nylon 66 of an antibody fixation-sized membrane (Immunodyne ABC; aperture = product made from 3.0 micrometer; Pall Corporation) was cut in 5mmx25mm size. After applying to the location of 15mm a rabbit anti-mouse immunoglobulin (Ig) antibody (product made from DAKO) [the solution dialyzed after dilution with the concentration 1 mg/mL; 5 mmol/L boric-acid buffer solution (pH8.5)] from the end of a membrane with a width of face of 1mm in the shape of a straight line, it put for 30 minutes at 1 hour, then 37 degrees C under the room temperature, and the antibody was fixed. It dipped in the 100 mmol/L borate buffer physiological salt solution (pH8.5) which contains monoethanolamine 0.5%, and under the room temperature, the membrane was put for 30 minutes and blocked. Furthermore, it dipped in the 100 mmol/L maleic-acid buffer physiological salt solution (pH7.5) which contains casein 0.5%, and under the room temperature, the membrane was put for 30 minutes and blocked further. After a physiological salt solution's having washed the membrane 3 times with distilled water once and removing superfluous blocking liquid, it saved in the silica gel desiccator, overnight desiccation was carried out under the room temperature, and it considered as the antibody fixation-sized membrane for immuno chromatographs (an antibody fixation-sized membrane is only called hereafter).

[0037] (2) Overnight dialysis of the preparation mouse IgG water-solution (concentration 1 mg/mL) 1mL of gold colloid indicator mouse IgG suspension was carried out at 4 degrees C in 3,000mL [are hereafter called the borax (Borax) buffer solution] (pH9.2). [ 2 mmol/L-Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> buffer-solution ] After carrying out centrifugal separation of the mouse IgG water solution by 100,000xg at 4 degrees C for 1 hour, the supernatant liquid was diluted with the borax buffer solution (pH9.2) which carried out centrifugal separation by 100,000xg for 1 hour so that mouse IgG concentration might serve as 100microg/mL.

[0038] On the other hand, 0.2 mol/L-K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution adjusted gold colloid liquid (product made from GOLD COLLOID 20; British BioCell International) 100mL to pH9.0. Agitating gold colloid liquid 20mL after pH adjustment, mouse IgG diluent 2mL was dropped gradually, and it agitated for 30 minutes under the room temperature. Furthermore, after 10% cow serum albumin (product made from A-7888; Sigma; BSA is called hereafter) solution (supernatant liquid which carried out centrifugal separation by 100,000xg by pH of 9.2; 4 degrees C for 1 hour) 2.5mL was dropped gradually, agitating, it agitated for 30 minutes under the room temperature. After adding water-solution (0.45-micrometer filter filtrate) 2.5mL which contains cane sugar and 0.2%Tween20 in this solution 5% and mixing with it, centrifugal separation was carried out by 16,000xg at 10 degrees C for 1 hour, and supernatant liquid was removed.

[0039] The precipitating gold colloid indicator mouse IgG was re-suspended in borax buffer-solution (pH filter filtrate of 8.0; 0.45 micrometers) 20mL which contains cane sugar and 0.02%Tween20 0.5%, centrifugal separation was carried out by 16,000xg at 10 degrees C for 1 hour, and supernatant liquid was removed. Furthermore, the precipitating gold colloid indicator mouse IgG was re-suspended in borax buffer-solution (pH8.0) 20mL which contains cane sugar and 0.02%Tween20 0.5%, centrifugal separation was carried out by 16,000xg at 10 degrees C for 1 hour, and supernatant liquid was removed. After re-suspending the precipitating gold colloid indicator mouse IgG at the end in the borax buffer solution (pH8.0) which contains cane sugar and 0.02%Tween20 0.5%, Concentration adjustment is carried out so that grain density may be set to about 1013/mL (the absorbance in the wavelength of 520nm = about 14). the glass test tube which carried out siliconizing of the front face -- moving -- sealing -- 4 degrees C -- saving -- an immuno chromatograph -- public funds -- it considered as colloid indicator mouse IgG (gold colloid antibody is called hereafter) suspension.

[0040] (3) The gold colloid antibody suspension prepared in the production aforementioned example 1 of a gold colloid antibody maintenance pad (2) Gold colloid grain density About 3x10<sup>12</sup>/mL, about 10<sup>12</sup>/mL, about 3x10<sup>11</sup>/mL, About 10<sup>11</sup>/mL, about 3x10<sup>10</sup>/mL, about 10<sup>10</sup>/mL, about 3x10<sup>9</sup>/mL, So that it may be set to about 10<sup>9</sup>/mL, about 3x10<sup>8</sup>/mL, about 10<sup>8</sup>/mL, about 3x10<sup>7</sup>/mL, about 10<sup>7</sup>/mL, about 3x10<sup>6</sup>/mL, or about 10<sup>6</sup>/mL After diluting with 5 mmol/L phosphate buffer (pH7.2) which contains cane sugar 5.0%, Apply 10micro of each diluent L to the absorption pad PREM1420 (product made from 5mmx5 mm; Pall Corporation), and overnight reduced pressure (<=100mmHg) desiccation is carried out under a room temperature within a silica gel desiccator. The gold colloid antibody maintenance pad for immuno chromatographs (a gold colloid antibody maintenance pad is called hereafter) was prepared.

[0041] (4) After dipping the production glass fiber pad (5mmx18mm) of a sample addition pad in the water solution which contains cane sugar, 0.2%Tween20, and 0.1% poly vinyl alcohol (polymerization degree = about 500) 0.5%, the superfluous water solution was removed, it was air-dry and the sample addition pad for

immuno chromatographs (a sample addition pad is called hereafter) was prepared.

[0042] (5) The production cellulose pad (product made from AP15; Millipore Coorporation) of an absorption pad was cut in 5mmx20mm size, and was used as the absorption pad for immuno chromatographs (an absorption pad is called hereafter).

[0043] (6) To the plastic pressure sensitive adhesive sheet (product made from BioDot) cut in the production 5mmx60mm size of a gold colloid antibody immuno chromatograph wafer The sample addition pad prepared in said example 1 (4) toward the downstream about the expansion direction from the upstream, The gold colloid antibody maintenance pad prepared in said example 1 (3), the antibody fixation-ized membrane prepared in said example 1 (1), And in order of the absorption pad prepared in said example 1 (5), the both ends were made to pile up mutually 1mm with the adjoining member, were stuck, and were respectively made into the gold colloid antibody immuno chromatograph wafer.

[0044] (7) Carried out constant-rate maintenance of the gold colloid antibody of the evaluation \*\*\*\*\* grain density of the detection sensitivity of a gold colloid antibody immuno chromatograph wafer. The gold colloid antibody immuno chromatograph wafer prepared in said example 1 (6) (it is attached to each grain density of gold colloid) It put two at a time horizontally, 0.5% cane sugar, 0.5%BSA, and 50micro (the mobile phase buffer solution is called hereafter) of 100 mmol/L phosphate buffer physiological salt solution L which contains Tween20 0.2% were dropped at each sample addition pad, and it developed for 10 minutes under the room temperature. The visual judgment of the existence of the coloring of purplish red - purple based on prehension of the gold colloid labelled antibody of the part (a detection zone is called hereafter) which fixed the rabbit anti-mouse Ig antibody on the membrane in one gold colloid antibody immuno chromatograph wafer among two was carried out. Moreover, after dropping silver sensitization liquid [product made from Silver Enhancing Kit(Cat.SEKB250);British BioCell International] 20microL and putting for 10 minutes under a room temperature on the detection zone in another [ which remains ] gold colloid antibody immuno chromatograph wafer, the existence of the brown coloring based on prehension and silver sensitization of a gold colloid antibody was judged. Furthermore, after putting for 30 minutes in the condition as it is, the existence of the brown coloring based on prehension and silver sensitization of a gold colloid antibody was judged.

[0045] A result is shown in Table 1. In Table 1, "silver sensitization method \*\*" shows the result after leaving it for 10 minutes behind the bottom of a silver sensitization drop, and "silver sensitization method \*\*\*" shows the result after leaving it for 40 minutes behind the bottom of a silver sensitization drop. In Table 1, it means that coloring of a detection zone can fully check "+++". "++" Although coloring of a detection zone is more slightly [ than the above "+++" ] thin, it means that coloring can fully be checked. "+" Although coloring of a detection zone is quite thinner than the above "+++", it means that coloring can fully be checked. "\*\*\*" Coloring of a detection zone is fairly thinner than the above "+++", it means that coloring can be checked very slightly, and "-" means that coloring of a detection zone is not checked.

[0046] In the coloring of purplish red - purple based on prehension of a gold colloid antibody, gold colloid grain density stopped at the ability to have checked coloring of a detection zone to about 1010/mL (particle number = 108). Also after putting for 10 minutes to it in the brown coloring based on prehension and silver sensitization of a gold colloid antibody, gold colloid grain density could check coloring of a detection zone to about 108/mL (particle number = 106), and it was able to detect to 1/100 of grain density as compared with the case of only the coloring of purplish red - purple based on prehension of a gold colloid antibody. Furthermore, after putting for 30 minutes, gold colloid grain density could check coloring of a detection zone to about 107/mL (particle number = 105), and it was able to detect to 1/1000 of grain density as compared with the case of only the coloring of purplish red - purple based on prehension of a gold colloid antibody.

[0047]

[Table 1]

金コロイド粒子密度 (個/mL)	検出ゾーンの着色度		
	金コロイド目視法	銀増感法①	銀増感法②
$3 \times 10^{12}$	+++	+++	+++
$10^{12}$	++	++	+++
$3 \times 10^{11}$	+	++	++
$10^{11}$	+	++	++
$3 \times 10^{10}$	±	++	++
$10^{10}$	±	++	++
$3 \times 10^9$	—	+	++
$10^9$	—	+	++
$3 \times 10^8$		±	+
$10^8$		±	+
$3 \times 10^7$		—	±
$10^7$		—	±
$3 \times 10^6$			—
$10^6$			—
0 (希釈液)	—	—	—

[0048]

[Example 2] Measurement [ of the lactoferrin by &lt;&lt;sandwiches immuno chromatography ]&gt;&gt;

(1) Add to the rabbit anti-mouse immunoglobulin antibody applied to the location of 15mm from the end of the production membrane of the membrane for sandwiches immuno chromatography of lactoferrin. furthermore, the location of the end of a membrane to 10mm -- mouse monoclonal anti-lactoferrin antibody 17B -- after dilution with the 04-08[concentration 1 mg/mL;5 mmol/L boric-acid buffer solution (pH8.5) Except having applied dialyzed solution] with a width of face of 1mm in the shape of a straight line, the membrane for sandwiches immuno chromatography of lactoferrin (17B04 -08 membrane is called hereafter) was prepared by repeating actuation of said example 1 (1). In addition, said mouse monoclonal anti-lactoferrin antibody 17B04-08 carried out immunity of the mouse with the conventional method by having made Homo sapiens lactoferrin (Sigma LO520) into immunogen, and was prepared.

[0049] (2) Instead of the preparation mouse IgG of gold colloid indicator mouse monoclonal anti-lactoferrin antibody suspension Except having used mouse monoclonal anti-lactoferrin antibody 32D 01-10 to 17B04 -08 antibody and lactoferrin molecule which were used in said example 2 (1) from which a binding site differs repeating actuation of said example 1 (2) -- the immuno chromatography of lactoferrin -- public funds -- colloid labelled antibody (32D01-10 gold colloid is called hereafter) suspension was prepared. In addition, said mouse monoclonal anti-lactoferrin antibody 32D 01-10 carried out immunity of the mouse with the conventional method by having made Homo sapiens lactoferrin (Sigma LO520) into immunogen, and prepared.

[0050] (3) The 32D01-10-carat colloidal suspension prepared in the production aforementioned example 2 of the gold colloid antibody maintenance pad for immuno chromatographs (2) So that gold colloid grain density may be set to about  $2.1 \times 10^{12}/\text{mL}$  (the absorbance in the wavelength of 520nm = about 3.0) After diluting with 5 mmol/L phosphate buffer (pH7.2) which contains cane sugar 5.0%, Apply 10micro of obtained diluents L to the absorption pad PREM1420 (product made from 5mmx5 mm;Pall Corporation), and overnight reduced pressure ( $\leq 100\text{mmHg}$ ) desiccation is carried out under a room temperature within a silica gel desiccator. The gold colloid antibody maintenance pad for immuno chromatographs (a 32D01-10 gold-colloid maintenance pad is called hereafter) was prepared.

[0051] (4) To the plastic pressure sensitive adhesive sheet (product made from BioDot) cut in the production 5mmx60mm size of the sandwiches immuno chromatograph wafer of lactoferrin The sample addition pad prepared in said example 1 (4) toward the downstream about the expansion direction from the upstream, The 32D01-10 gold-colloid maintenance pad prepared in said example 2 (3), In order of 17B04 -08 membrane prepared in said example 2 (1), and the absorption pad prepared in said example 1 (5), the both ends were made to pile up mutually 1mm with the adjoining member, and were stuck respectively, and the sandwiches immuno chromatograph wafer of lactoferrin was prepared.

[0052] (5) Put horizontally the sandwiches immuno chromatograph wafer of the lactoferrin prepared in the evaluation aforementioned example 2 of the detection sensitivity of the sandwiches immuno chromatograph wafer of lactoferrin (4). The lactoferrin standard solution which dissolved in each sample addition pad at said mobile phase buffer solution (concentration = 0.1 ng/mL, 0.2 ng/mL, 0.3 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1.0 ng/mL, 2.0 ng/mL, 3.0 ng/mL, 5.0 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 30 ng/mL, 50 ng/mL, and 100 ng/mL) 50microL were dropped, and it developed for 10 minutes under the room temperature. Visual observation of the existence of the coloring of purplish red - purple based on prehension of the 32D01-10 gold colloid of the part (namely, detection zone) which fixed 17B04 -08 antibody on the 17B04-08 membrane in the sandwiches immuno chromatograph wafer of lactoferrin was carried out, and the minimum detection concentration of a lactoferrin standard solution was judged (even when it was small in the detection zone, concentration of the lactoferrin standard solution with which coloring of purplish red - purple was accepted was made into the minimum detection concentration).

[0053] Immediately then, on said detection zone in the sandwiches immuno chromatograph wafer of each lactoferrin After dropping 50micro of silver sensitization liquid L and putting for 10 minutes under a room temperature, visual observation of the existence of the brown coloring based on prehension of 32D01-10 gold colloid and the silver sensitization of gold colloid is carried out. The minimum detection concentration of a lactoferrin standard solution was judged (even when it was small in the detection zone, concentration of the lactoferrin standard solution with which brown coloring was accepted was made into the minimum detection concentration).

[0054] A result is shown in Table 2. or [ that the coloring of a detection zone of "+" is deep in Table 2 to the same extent as coloring of a control zone (part which fixed the rabbit anti-mouse immunoglobulin antibody on the 17B04-08 membrane in the sandwiches immuno chromatograph wafer of lactoferrin) ] -- or It means that it is extent for which coloring of a visual judgment is fully possible even if thin. "\*\*\*" Coloring of a detection zone is quite thin as compared with a control zone, and it means that it is extent in which very slight coloring can carry out a visual judgment, and "-" means that coloring of a detection zone cannot carry out a visual judgment, although coloring of a control zone is accepted.

[0055] In the coloring of purplish red - purple based on prehension of 32D01-10 gold colloid, the concentration of a lactoferrin standard solution was able to check coloring of a detection zone to 20 ng/mL. To it, in the brown coloring based on prehension of 32D01-10 gold colloid, and the silver sensitization of gold colloid, the concentration of a lactoferrin standard solution could check coloring of a detection zone to 1.0 ng/mL, and even the lactoferrin standard solution of 1/20 of concentration was able to be detected as compared with the case of only the coloring of purplish red - purple based on the supplement of 32D01-10 gold colloid.

[0056]

[Table 2]

ラクトフェリン標準溶液濃度 (ng/mL)	検出ゾーンの着色度	
	金コロイド目視法	銀増感法
100	+	+
50	+	+
30	+	+
20	±	+
10	—	+
5.0	—	+
3.0	—	+
2.0	—	+
1.0	—	±
0.5		—
0.3		—
0.2		—
0.1		—
0 (希釈液)	—	—

[0057]

[Example 3] Measurement [ of the lactoferrin by <<antigen fixed direct contention immuno chromatography ]>>

(1) Instead of the production mouse monoclonal anti-lactoferrin antibody (17B04 -08 antibody) of the membrane for direct contention immuno chromatography of lactoferrin, the membrane for direct contention immuno chromatography of lactoferrin (Lf membrane is called hereafter) was prepared by repeating actuation of said example 2 (1) except having used Homo sapiens lactoferrin (the product made from Sigma: Lf being called hereafter).

[0058] (2) The 32D01-10-carat colloidal suspension prepared in the production aforementioned example 2 of a gold colloid antibody maintenance pad (2) So that gold colloid grain density may be set to about  $1.4 \times 10^{12}/\text{mL}$  (the absorbance in the wavelength of 520nm = about 2.0), or about  $7 \times 10^{10}/\text{mL}$  (the absorbance in the wavelength of 520nm = about 0.1) After diluting with 5 mmol/L phosphate buffer (pH7.2) which contains cane sugar 5.0%, Apply 5micro of obtained diluents L to the absorption pad PREM1420 (product made from 5mmx5 mm;Pall Corporation), and overnight reduced pressure ( $\leq 100\text{mmHg}$ ) desiccation is carried out under a room temperature within a silica gel desiccator. The gold colloid antibody maintenance pad for immuno chromatographs of lactoferrin was prepared. Said maintenance pad which applied hereafter the diluent whose gold colloid grain density is about  $1.4 \times 10^{12}/\text{mL}$  is called the maintenance pad for a gold colloid viewing judging. Moreover, said maintenance pad which applied the diluent whose gold colloid grain density is about  $7 \times 10^{10}/\text{mL}$  is called the maintenance pad for gold colloid silver sensitization.

[0059] (3) To the plastic pressure sensitive adhesive sheet (product made from BioDot) cut in the production 5mmx60mm size of the direct contention immuno chromatograph wafer of lactoferrin The sample addition pad prepared in said example 1 (4) toward the downstream about the expansion direction from the upstream, The maintenance pad for a gold colloid viewing judging prepared in said example 3 (2), Lf membrane prepared in said example 3 (1), And in order of the absorption pad prepared in said example 1 (5), the both ends were made to pile up mutually 1mm with the adjoining member, and were stuck respectively, and the immuno chromatograph wafer for a gold colloid viewing judging of lactoferrin was prepared. To moreover, the plastic pressure sensitive adhesive sheet (product made from BioDot) cut in 5mmx60mm size The sample addition pad prepared in said example 1 (4) toward the downstream about the expansion direction from the upstream, The maintenance pad for gold colloid silver sensitization prepared in said example 3 (2), Lf membrane prepared in said example 3 (1), And in order of the absorption pad prepared in said example 1 (5), the both ends were made to pile up mutually 1mm with the adjoining member, and were stuck respectively, and the immuno chromatograph wafer for gold colloid silver sensitization of lactoferrin was prepared.

[0060] (4) Put horizontally the immuno chromatograph wafer for a gold colloid viewing judging of the lactoferrin prepared in the evaluation aforementioned example 3 of the detection sensitivity of the direct contention immuno chromatograph wafer of lactoferrin (3), and the immuno chromatograph wafer for gold colloid silver sensitization of lactoferrin. The lactoferrin standard solution which dissolved in each sample addition pad at said mobile phase buffer solution (concentration = 0.1 ng/mL) 0.2 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1.0 ng/mL, 2.0 ng/mL, 5.0 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL, and 100 ng/mL 50microL were dropped, and it developed for 10 minutes under the room temperature. Visual observation of the existence of the coloring of purplish red - purple based on prehension of the 32D01-10 gold colloid of the part (namely, detection zone) which fixed the lactoferrin on the membrane in the immuno chromatograph wafer for a gold colloid viewing judging of lactoferrin was carried out, and the minimum detection concentration of a lactoferrin standard solution was judged (coloring of the purplish red of a detection zone - purple made concentration of the lactoferrin standard solution which disappeared completely the minimum detection concentration).

[0061] On the other hand on the detection zone on the membrane in the immuno chromatograph wafer for gold colloid silver sensitization After dropping 50micro of silver sensitization liquid L immediately and putting for 10 minutes under a room temperature after said expansion of gold colloid, Visual observation of the existence of the brown coloring based on prehension of 32D01-10 gold colloid and the silver sensitization of gold colloid was carried out, and the minimum detection concentration of a lactoferrin standard solution was judged (brown coloring of a detection zone made concentration of the lactoferrin standard solution which disappeared completely the minimum detection concentration).

[0062] A result is shown in Table 3. In Table 3, "+" means that coloring of a detection zone cannot carry out a visual judgment although coloring of a control zone is accepted, in "\*\*\*", although coloring of a control zone is accepted, the degree of coloring of a detection zone comes out very only, a certain thing is meant, it is both a detection zone and a control zone, and "-" means that coloring can judge by viewing.

[0063] In the coloring of purplish red - purple based on prehension of 32D01-10 gold colloid, the concentration of a lactoferrin standard solution was able to check disappearance of coloring of a detection zone to 50 ng/mL. To it, in the brown coloring based on prehension of 32D01-10 gold colloid, and the silver sensitization of gold colloid, the concentration of a lactoferrin standard solution could check disappearance of coloring of a detection zone, and was able to detect even the lactoferrin standard solution of 1/10 of concentration to 5 ng/mL as compared with the case of only the coloring of purplish red - purple based on the supplement of 32D01-10 gold colloid.

[0064]

[Table 3]

ラクトフェリン標準溶液濃度 (ng/mL)	検出ゾーンの着色度	
	金コロイド目視法	銀増感法
100	+	+
50	+	+
20	—	+
10	—	+
5.0	—	±
2.0	—	—
1.0	—	—
0.5		—
0.2		—
0.1		—
0 (希釈液)	—	—

[0065]

[Example 4] Measurement [ of the Okada acid by <<antigen fixed direct contention immuno chromatography ]>>

(1) The membrane made from production Nylon 66 of the membrane for direct contention immuno chromatography of the Okada acid was cut in 5mmx25mm size. An ethylenediamine solution [the diluted solution diluted with the concentration 10 mg/mL; 5 mmol/L boric-acid buffer solution (pH8.5)] is applied to the location of 10mm from the end of a membrane with a width of face of 1mm in the shape of a straight line. furthermore, the location of the end of a membrane to 15mm -- a rabbit anti-mouse -- after dilution with the (Immunoglobulin Ig) antibody (product made from DAKO) [concentration 1 mg/mL; 5 mmol/L boric-acid buffer solution (pH8.5) After applying dialyzed solution] with a width of face of 1mm in the shape of a straight line, it put for 30 minutes at 37 degrees C under the room temperature for 1 hour. After it dipped the membrane in the 100 mmol/L borate buffer physiological salt solution (pH8.5) which contains monoethanolamine 0.5% and it carried out the shaking for 30 minutes under the room temperature, distilled water (distilled water filtered with 0.45-micrometer filter) washed 4 times, and it was made to dry at 37 degrees C.

[0066] Okada acid (Wako Pure Chem make; OA is called hereafter) 50microg, 1-ethyl -3-(3-dimethylaminopropyl)- After melting carbodiimide hydrochloride 238microg and N-hydroxy SUKUSHINIMIDO 71.5microg to 100micro [ of N.N-dimethylformamide ] L and making it react under a room temperature for 1 hour, the about 1microL was applied to the location which applied the ethylenediamine solution on said membrane in piles. After making it react under a room temperature for 1 hour and making it react for 10 minutes at 37 more degrees C, the membrane was dipped in the 100 mmol/L borate buffer physiological salt solution (pH8.5) which contains monoethanolamine 0.5%, and was shaken for 30 minutes under the room temperature. Furthermore, it dipped in the 100 mmol/L maleic-acid buffer physiological salt solution (pH7.5) which contains casein 0.5%, and under the room temperature, the membrane was put for 30 minutes and blocked. After a physiological salt solution's having washed the

membrane 3 times with distilled water once and removing superfluous blocking liquid, it saved in the silica gel desiccator, overnight desiccation was carried out under the room temperature, and the membrane for direct contention immuno chromatography of the Okada acid (OA membrane is called hereafter) was prepared.

[0067] (2) repeating actuation of said example 2 (2) instead of the preparation mouse IgG of gold colloid indicator mouse monoclonal anti-OKADA acid antibody suspension except having used 958 to mouse monoclonal anti-OKADA acid antibody 2 antibody -- the immuno chromatography of the Okada acid -- public funds -- colloid labelled antibody (958-2 gold colloid is called hereafter) suspension was prepared. In addition, said 958 to mouse monoclonal anti-OKADA acid antibody 2 antibody carried out immunity of the mouse with the conventional method by having made Okada acid-Homo sapiens immunoglobulin G complex into immunogen, and was prepared.

[0068] (3) The 958 -2-carat colloidal suspension prepared in the production aforementioned example 4 of the gold colloid antibody maintenance pad for immuno chromatographs (2) So that gold colloid grain density may be set to about  $7.1 \times 10^{11}/\text{mL}$  (the absorbance in the wavelength of 520nm = about 1.0), or about  $1.4 \times 10^9/\text{mL}$  (the absorbance in the wavelength of 520nm = about 0.002) After diluting with 5 mmol/L phosphate buffer (pH7.2) which contains cane sugar 5.0%, 5micro of obtained diluents L -- the absorption pad PREM1420 -- applying -- the inside of a silica gel desiccator -- overnight reduced pressure ( $\leq 100\text{mmHg}$ ) desiccation under a room temperature -- carrying out -- the immuno chromatograph of the Okada acid -- public funds -- the colloid antibody maintenance pad was prepared. Said maintenance pad which applied hereafter the diluent whose gold colloid grain density is about  $7.1 \times 10^{11}/\text{mL}$  is called the maintenance pad for a gold colloid viewing judging. Moreover, said maintenance pad which applied the diluent whose gold colloid grain density is about  $1.4 \times 10^9/\text{mL}$  is called the maintenance pad for gold colloid silver sensitization.

[0069] (4) To the plastic pressure sensitive adhesive sheet (product made from BioDot) cut in the production 5mmx60mm size of the direct contention immuno chromatograph wafer of the Okada acid The sample addition pad prepared in said example 1 (4) toward the downstream about the expansion direction from the upstream, The maintenance pad for a gold colloid viewing judging prepared in said example 4 (3), OA membrane prepared in said example 4 (1), In order of the absorption pad prepared in said example 1 (5), the both ends were made to pile up mutually 1mm with the adjoining member, and were stuck respectively, and the immuno chromatograph wafer for a gold colloid viewing judging of the Okada acid was prepared. To moreover, the plastic pressure sensitive adhesive sheet (product made from BioDot) cut in 5mmx60mm size The sample addition pad prepared in said example 1 (4) toward the downstream about the expansion direction from the upstream, The maintenance pad for gold colloid silver sensitization prepared in said example 4 (3), OA membrane prepared in said example 4 (1), In order of the absorption pad prepared in said example 1 (5), the both ends were made to pile up mutually 1mm with the adjoining member, and were stuck respectively, and the immuno chromatograph wafer for gold colloid silver sensitization of the Okada acid was prepared.

[0070] The immuno chromatograph wafer for a gold colloid viewing judging of the Okada acid prepared in the evaluation aforementioned example 4 of the detection sensitivity of the direct contention immuno chromatograph wafer of the Okada acid (4) and the immuno chromatograph wafer for gold colloid silver sensitization of the Okada acid are put horizontally. (5) To each sample addition pad The Okada acid standard solution which dissolved in said mobile phase buffer solution (concentration = 1.0 ng/mL) 2.0 ng/mL, 5.0 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 500 ng/mL, and 1.0microg/mL50microL were dropped, and it developed for 10 minutes under the room temperature. Visual observation of the existence of the coloring of purplish red - purple based on prehension of the 958-2 gold colloid of the part (namely, detection zone) which fixed OA on the membrane on the immuno chromatograph wafer for a gold colloid viewing judging of the Okada acid was carried out, and the minimum detection concentration of the Okada acid standard solution was judged (coloring of the purplish red of a detection zone - purple made concentration of the Okada acid standard solution which disappeared completely the minimum detection concentration).

[0071] On the other hand on the detection zone on the membrane in the immuno chromatograph wafer for gold colloid silver sensitization After dropping 50micro of silver sensitization liquid L immediately and putting for 30 minutes under a room temperature after said expansion of gold colloid, Visual observation of the existence of the brown coloring based on prehension of 958-2 gold colloid and the silver sensitization of



gold colloid was carried out, and the minimum detection concentration of the Okada acid standard solution was judged (brown coloring of a detection zone made concentration of the Okada acid standard solution which disappeared completely the minimum detection concentration).

[0072] A result is shown in Table 4. "+" in Table 4, "\*\*\*", and "-" are the same semantics as Table 3. It stopped at the ability of the concentration of the Okada acid standard solution to have checked disappearance of coloring of a detection zone to 200 ng/mL in the coloring of purplish red - purple based on prehension of 958-2 gold colloid. To it, in the brown coloring based on prehension of 958-2 gold colloid, and the silver sensitization of gold colloid, the concentration of the Okada acid standard solution could check disappearance of coloring of a detection zone, and was able to detect even the Okada acid standard solution of 1/20 of concentration to 10 ng/mL as compared with the case of only the coloring of purplish red - purple based on the supplement of 958-2 gold colloid.

[0073]

[Table 4]

オカダ酸標準溶液濃度 (ng/mL)	検出ゾーンの着色度	
	金コロイド目視法	銀増感法
1000	+	+
500	+	+
200	+	+
100	—	+
50	—	+
20	—	+
10	—	+
5.0		—
2.0		—
1.0		—
0 (希釈液)	—	—

[0074]

[Effect of the Invention] According to the immuno chromatography of this invention, the analysis object in a specimen can be further analyzed to high sensitivity rather than immuno chromatography quick and well-known simple moreover conventionally.

[Translation done.]

#### \* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

## DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the top view showing typically one mode of the wafer for immuno chromatographs which can be used for the immuno chromatography of this invention.

[Description of Notations]

1 ... sample addition pad; -- 2 ... labeling matter maintenance pad; -- 3 ... fixed membrane; -- 4 ... absorption pad; -- 5 ... pressure sensitive adhesive sheet; -- 10 ... the wafer for immuno chromatographs.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2002-202307  
(P2002-202307A)

(43) 公開日 平成14年7月19日 (2002.7.19)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード <sup>*</sup> (参考)
G 0 1 N 33/543	5 2 1 5 4 1	G 0 1 N 33/543	5 2 1 5 4 1 Z

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2000-399268 (P2000-399268)

(22) 出願日 平成12年12月27日 (2000.12.27)

(71) 出願人 000138277

株式会社ヤトロン  
東京都千代田区東神田 1 丁目 11 番 4 号

(72) 発明者 松浦 司郎

東京都千代田区東神田 1 丁目 11 番 4 号 株  
式会社ヤトロン内

(72) 発明者 別府 佳紀

東京都千代田区東神田 1 丁目 11 番 4 号 株  
式会社ヤトロン内

(74) 代理人 100090251

弁理士 森田 憲一

(54) 【発明の名称】 イムノクロマトグラフ法

(57) 【要約】

【課題】 迅速且つ簡便であって、しかも、従来公知のイムノクロマトグラフ法よりも更に高感度なイムノクロマトグラフ法を提供する。

【解決手段】 分析対象物及びそれと特異的に結合する抗体又は抗原による免疫反応を利用し、固定化された免疫複合体に由来する標識の信号を分析するイムノクロマトグラフ法において、金属コロイド標識及び金属硫化物標識からなる群から選んだ標識に金属イオン及び還元剤を接触させ、前記還元剤による前記金属イオンの還元により生じた金属粒子を前記標識に沈着させ、前記固定化免疫複合体上の前記沈着物を分析する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 分析対象物及びそれと特異的に結合する抗体又は抗原による免疫反応を利用し、固定化された免疫複合体に由来する標識の信号を分析するイムノクロマトグラフ法において、金属コロイド標識及び金属硫化物標識からなる群から選んだ標識に金属イオン及び還元剤を接触させ、前記還元剤による前記金属イオンの還元により生じた金属粒子を前記標識に沈着させ、前記固定化免疫複合体上の前記沈着物を分析することを特徴とする、前記イムノクロマトグラフ法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規のイムノクロマトグラフ法に関する。本発明のイムノクロマトグラフ法によれば、被検試料中の分析対象物を免疫学的に捕捉すると同時に、あるいは、捕捉した後、分析対象物を高感度に分析することができる。本明細書における「分析」には、分析対象物質の存在の有無を判定する「検出」と、分析対象物質の量を定量的又は半定量的に決定する「測定」とが含まれる。

## 【0002】

【従来の技術】天然物、毒素、ホルモン、又は農薬等の生理活性物質又は環境汚染物質の中には、極微量で作用するものが非常に多い。従って、これらの物質の定性的及び定量的測定には、従来、高感度分析が可能な機器分析法が広く用いられてきた。しかし、機器分析法は、特異性が低く、試料の前処理工程を含め、分析に時間を要する上、操作が煩雑なため、近年要求されている迅速簡便測定目的には不都合である。一方、免疫学的測定法は、特異性も高く、操作も機器分析よりはるかに簡便であることから、生理活性物質又は環境汚染物質の測定分野に徐々に普及してきた。しかし、96穴プレートを用いた酵素免疫測定法やラテックス凝集法のような従来の免疫学的測定法は、必ずしも測定の迅速簡便性又は検出感度を満たすものではなかった。

【0003】近年、ヒト絨毛性ゴナドトロピンを指標とする妊娠診断薬に用いられたことから、測定の迅速簡便性を満たす方法として脚光を浴びている免疫学的測定法に、イムノクロマトグラフ法がある。例えば、サンドイッチ法を利用したイムノクロマトグラフ法では、分析対象物（例えば、抗原）に特異的に結合する第1抗体を特定の領域に固定した不溶性薄膜状支持体（例えば、ガラス繊維膜、ナイロン膜、又はセルロース膜など）中に、分析対象物と特異的に結合する標識化第2抗体と、分析対象物を含む可能性のある検体溶液とを展開し、不溶性薄膜状支持体の第1抗体を固定した領域上で、分析対象物との免疫複合体を形成させ、標識の着色又は発色などの信号を検出し、分析対象物を測定することができる。なお、前記標識としては、例えば、酵素を含むタンパク質、着色ラテックス粒子、金属コロイド、又は炭素粒子

を使用することができる。このイムノクロマトグラフ法は、分析対象物を含む可能性のある検体溶液を滴下した後、約5～10分間静置するだけで測定結果が得られる迅速且つ簡便な方法である上、分析対象物の検出感度も酵素免疫測定法に匹敵するほど高感度である。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかし、前記の天然物、毒素、ホルモン、又は農薬等の生理活性物質又は環境汚染物質は、こうしたイムノクロマトグラフ法における従来の検出法では検出できない極微量で作用する物質が多く、それらの迅速、簡便、且つ高感度の検出法の開発が不可欠である。従来、展開の手段を工夫した技術（特開平1-32169号公報及び特開平4-299262号公報）、着色粒子を工夫した技術（特開平5-10950号公報及び特開平5-133956号公報）、展開部材を工夫した技術（特開平7-318560号公報）、アビジン-ビオチン結合を利用した技術（特開平10-68730号公報）、及び酵素免疫法を利用した技術（特開平11-69996号公報）等、高感度化を目指した数多くの改良技術が開示されているが、いまだ満足することのできる技術は提供されていないのが実情である。従って、本発明の課題は、迅速且つ簡便であって、しかも、従来公知のイムノクロマトグラフ法よりも更に高感度なイムノクロマトグラフ法を提供することにある。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】前記課題は、本発明による、分析対象物及びそれと特異的に結合する抗体又は抗原による免疫反応を利用し、固定化された免疫複合体に由来する標識の信号を分析するイムノクロマトグラフ法において、金属コロイド標識及び金属硫化物標識からなる群から選んだ標識に金属イオン及び還元剤を接触させ、前記還元剤による前記金属イオンの還元により生じた金属粒子を前記標識に沈着させ、前記固定化免疫複合体上の前記沈着物を分析することを特徴とする、前記イムノクロマトグラフ法により解決することができる。

【0006】本明細書において、「イムノクロマトグラフ法」とは、特に限定されるものではないが、例えば、その工程中にクロマトグラフ法（特に、薄層クロマトグラフ法又はペーパークロマトグラフ法）を用いる工程を含み、1又は複数の抗原抗体反応の少なくとも一部をクロマトグラフ用の薄膜状支持体上で展開しながら実施する免疫学的分析法を挙げることができる。なお、本明細書において、「薄膜状支持体」は、固定相を意味し、例えば、薄層クロマトグラフ法では、支持板（例えば、ガラス板、アルミニウム板、又はプラスチック板）に固着させた薄層を意味し、ペーパークロマトグラフ法では、濾紙を意味する。

## 【0007】

【発明の実施の形態】一般に、イムノクロマトグラフ法

においては、少なくとも分析対象物と固定化抗体又は抗原と標識とを含む免疫複合体を不溶性薄膜状支持体上

(又は前記支持体内)に形成させ、その免疫複合体に由来する標識の信号を分析する。本発明方法によれば、標識として金属コロイド標識又は金属硫化物標識(以下、金属コロイド標識と金属硫化物標識とを併せて、金属系標識と称することがある)を用いるイムノクロマトグラフ法において、前記金属系標識の信号を増幅あるいは増感させることができる。具体的には、前記免疫複合体の形成過程において、あるいは前記免疫複合体の形成後

に、還元剤及び金属イオンを接触させ、還元剤によって金属イオンを還元して金属粒子を生成させると、その金属粒子が前記金属系標識を核として前記金属系標識上に沈着するので、前記金属系標識が増幅され、分析対象物の分析を高感度に行うことができる。従って、本発明のイムノクロマトグラフ法は、還元剤による金属イオンの還元作用により生じた金属粒子を用いて、免疫複合体の標識に沈着させる反応を実施し、こうして増幅された信号を分析することを除けば、それ以外の点では従来公知のイムノクロマトグラフ法をそのまま適用することが

【0008】本発明のイムノクロマトグラフ法としては、抗原抗体反応の実施順序、固定化及び標識化する対象化合物、標準化合物の使用の有無、並びに使用する抗体の数などに応じて種々の方式が存在する。なお、本明細書において「標準化合物」とは、分析対象化合物に相当する化合物を意味する。例えば、被検試料中のラクトフェリンを分析する場合には、市販のラクトフェリンを使用することができ、被検試料中のオカダ酸を分析する場合には、市販のオカダ酸を使用することができる。

【0009】本発明によるイムノクロマトグラフ法の具体的態様としては、例えば、  
(1) 分析対象物(抗原)を含む可能性のある被検試料と、標識を有する既知量の標準化合物(以下、標識化標準化合物と称する)とを展開させながら接触させる工程；

(2) 前記工程(1)と同時に又は前記工程(1)の終了後に、前記分析対象物に対して特異性を有すると共に適当な不溶性薄膜状支持体上に固定させた抗体に、前記標識化標準化合物を展開させながら接触させる工程；

(3) 前記固定化抗体と結合した標識化標準化合物と、前記固定化抗体と結合していない標識化標準化合物とを分離する工程；及び

(4) 前記固定化抗体と結合した標識化標準化合物の標識に、金属イオン及び還元剤を接触させることにより、前記還元剤による前記金属イオンの還元により生じた金属粒子を前記標識に沈着させ、生じた前記沈着物を分析する工程を含む、イムノクロマトグラフ法を挙げることができる。

この方法は、通常、抗体固定化競合法(直接的競合法及

び間接的競合法を含む)と呼ばれる方法に、本発明のイムノクロマトグラフ法を適用したものである。なお、前記態様は、前記工程(4)において金属イオン及び還元剤を接触させる態様であるが、本発明のイムノクロマトグラフ法においては、前記工程(1)～(3)において金属イオン及び還元剤を接触させることもできる。

【0010】また、本発明によるイムノクロマトグラフ法の別の具体的態様としては、例えば、

(1) 分析対象物(抗原)に対して特異性を有すると共に標識を有する既知量の抗体(以下、標識化抗体と称する)と、分析対象物を含む可能性のある被検試料とを、展開させながら、あるいは、展開前に、接触させる工程；

(2) 前記工程(1)と同時に又は前記工程(1)の終了後に、適当な不溶性薄膜状支持体上に固定させた既知量の標準化合物(以下、固定化標準化合物と称する)に、前記標識化抗体を展開させながら接触させる工程；

(3) 前記固定化標準化合物と結合した標識化抗体と、前記固定化標準化合物と結合していない抗体とを分離する工程；及び

(4) 固定化標準化合物と結合した標識化抗体の標識に、金属イオン及び還元剤を接触させることにより、前記還元剤による前記金属イオンの還元により生じた金属粒子を前記標識に沈着させ、生じた前記沈着物を分析する工程を含む、イムノクロマトグラフ法を挙げることができる。

この方法も、通常、抗原固定化競合法(直接的競合法及び間接的競合法を含む)と呼ばれる方法に、本発明のイムノクロマトグラフ法を適用したものである。なお、前記態様は、前記工程(4)において金属イオン及び還元剤を接触させる態様であるが、本発明のイムノクロマトグラフ法においては、前記工程(1)～(3)において金属イオン及び還元剤を接触させることもできる。

【0011】本発明によるイムノクロマトグラフ法の更に別の具体的態様としては、例えば、

(1) 分析対象物(抗原)に対して特異性を有する第1抗体を、適当な不溶性薄膜状支持体上に固定させる工程；

(2) 前記分析対象物を含む可能性のある被検試料を、前記固定化第1抗体に接触させる工程；

(3) 前記分析対象物に対して前記第1抗体とは異なる部位で結合すると共に標識を有する第2抗体を、過剰量で、前記工程(2)より以前に、同時に、あるいは、終了後に接触させる工程；及び

(4) 固定化第1抗体と分析対象物との免疫複合体に結合した第2抗体上の標識に、金属イオン及び還元剤を接触させることにより、前記還元剤による前記金属イオンの還元により生じた金属粒子を前記標識に沈着させ、生じた前記沈着物を分析する工程を含む、イムノクロマトグラフ法を挙げることができる。

この方法は、通常、サンドウィッチ法と呼ばれる方法に、本発明のイムノクロマトグラフ法を適用したものである。なお、前記態様は、前記工程（４）において金属イオン及び還元剤を接触させる態様であるが、本発明のイムノクロマトグラフ法においては、前記工程（３）において金属イオン及び還元剤を接触させることもできる。

【0012】本発明によるイムノクロマトグラフ法の更に別の具体的態様としては、例えば、

（１）分析対象物（抗体）に対して特異的に結合する抗原を、適当な不溶性薄膜状支持体上に固定させる工程；

（２）前記分析対象物を含む可能性のある被検試料を、前記固定化抗原に接触させる工程；

（３）前記分析対象物に対して特異性を有すると共に標識を有する第２抗体を、過剰量で、前記工程（２）より以前に、同時に、あるいは、終了後に接触させる工程；及び

（４）固定化抗原と分析対象物との免疫複合体に結合した第２抗体上の標識に、金属イオン及び還元剤を接触させることにより、前記還元剤による前記金属イオンの還元により生じた金属粒子を前記標識に沈着させ、生じた前記沈着物を分析する工程を含む、イムノクロマトグラフ法を挙げることができる。この方法は、通常、固定抗原法と呼ばれる方法に、本発明のイムノクロマトグラフ法を適用したものである。なお、前記態様は、前記工程（４）において金属イオン及び還元剤を接触させる態様であるが、本発明のイムノクロマトグラフ法においては、前記工程（３）において金属イオン及び還元剤を接触させることもできる。また、本発明は、その他公知のイムノクロマトグラフ法に広く応用することができる。

【0013】本発明のイムノクロマトグラフ法では、分析対象物（抗原又は抗体）と特異的に結合する抗体若しくは抗原、又は標準化合物を標識するのに用いる標識として、金属コロイド標識又は金属硫化物標識を用いる。前記金属コロイド標識又は金属硫化物標識としては、通常のイムノクロマトグラフ法に用いることができる標識である限り、特に限定されるものではなく、金属コロイド標識としては、例えば、白金コロイド、金コロイド、又は銀コロイドを挙げることができ、金属硫化物標識としては、例えば、鉄、銀、鉛、銅、カドミウム、ビスマス、アンチモン、錫、又は水銀の各硫化物を挙げることができる。本発明のイムノクロマトグラフ法においては、これらの金属コロイド標識及び／又は金属硫化物標識の１又はそれ以上を標識として用いることができる。

【0014】本発明のイムノクロマトグラフ法において、標識の信号増幅に使用することのできる金属イオンとしては、還元により生じる金属粒子が標識を核として沈着することのできる金属イオンである限り、特に限定されるものではないが、例えば、銀イオン、白金イオン、又は金イオンを挙げることができる。本発明のイム

ノクロマトグラフ法では、前記銀イオンとしては、例えば、硝酸銀、酢酸銀、又は乳酸銀を、液状（例えば、銀イオンの水溶液又は水性有機溶液）又は固体状で 사용할ことができる。

【0015】本発明のイムノクロマトグラフ法において、標識の信号増幅に使用することのできる還元剤としては、前記金属イオンを還元して金属粒子を発生することの可能な還元剤である限り、特に限定されるものではないが、例えば、ハイドロキノン又はその誘導体（例えば、プロモハイドロキノン）を挙げることができる。

【0016】本発明のイムノクロマトグラフ法では、還元剤による金属イオンの還元により生じた金属粒子が、前記金属コロイド標識又は金属硫化物標識を核として沈着する反応を利用することにより、標識の信号増幅を実施する。なお、前記反応それ自体は、公知の方法【例えば、Danscher及びNorgaardの方法（J. Histochem. Cytochem., 31, 1394, 1983）、Holgateらの方法（J. Histochem. Cytochem., 31, 938, 1983）、藤森らの方法（Arch. Histol. Jap., 48, 449, 1985）、中村らの方法（Histochem. J., 17, 47, 1985）、Danscherの方法（Histochemistry, 71, 1, 1981）、Skutelskyらの方法（Histochemistry, 86, 291, 1987）、Hackerらの方法（J. Histotechnology, 11, 213, 1988）、Scopsi及びLarssonの方法（Histochemistry, 82, 321, 1985）、Moeremansらの方法（J. Immunol. Methods, 74, 353, 1983）】である。

【0017】本発明のイムノクロマトグラフ法では、特に限定されるものではないが、例えば、pH3～4のpH調節剤（例えば、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、又は乳酸緩衝液）中で、保護コロイド（例えば、アラビアゴム）の共存下あるいは非共存下で、金属イオン〔特に、銀イオン（例えば、硝酸銀、酢酸銀、又は乳酸銀）の還元剤（例えば、ハイドロキノン又はプロモハイドロキノン）による還元作用で生じる金属粒子（例えば、銀粒子）を前記免疫複合体上の標識を核として沈着させ、前記免疫複合体上の沈着物を分析することができる。】

【0018】前記沈着物の分析方法は、特に限定されるものではないが、例えば、目視により、あるいは、反射光を適当な測定装置（例えば、反射光測定装置又はスキヤナー等）で分析することにより実施することができる。

【0019】本発明のイムノクロマトグラフ法では、標識と金属イオン及び還元剤とを接触させる方法の具体的な態様は特に限定されるものではないが、例えば、被検試

料を展開した後に、免疫複合体上の標識に対して、金属イオン及び還元剤の両方を含む溶液を添加することもできるし、あるいは、金属イオン溶液と還元剤溶液とを同時又は順に添加することもできる。あるいは、標識化標準化合物、標識化抗体、若しくは標識化第2抗体、又は被検試料を含む溶液に、予め金属イオン及び還元剤を更に添加した溶液を用いて、薄膜状支持体上で同時に展開させることもできる。更には、被検試料を展開した後に、金属イオン及び還元剤を含む溶液を展開させることもできる。

【0020】本発明のイムノクロマトグラフ法で分析することのできる被検試料としては、分析対象物を含む可能性のある試料である限り、特に限定されるものではなく、例えば、生物学的試料、特に動物（特にヒト）の体液（例えば、血液、血清、血漿、髄液、涙液、汗、尿、膿、又は喀痰）若しくは排泄物（例えば、糞便）、臓器、組織、又は動植物それ自体若しくはそれらの乾燥体を挙げることができる。

【0021】本発明のイムノクロマトグラフ法では、前記被検試料をそのまま、あるいは、前記被検試料を適当な抽出用溶媒を用いて抽出して得られる抽出液の形で、更には、前記抽出液を適当な希釈剤で希釈して得られる希釈液の形で、用いることができる。前記抽出用溶媒としては、通常免疫学的分析法で用いられる溶媒（例えば、水、生理食塩液、又は緩衝液等）、あるいは、前記溶媒で希釈することにより直接抗原抗体反応を実施することができる水混和性有機溶媒を用いることもでき、有機溶媒と水との混合物が好ましい。前記水混和性有機溶媒としては、例えば、アルコール化合物（例えば、炭素原子1～3個の低級アルコール；特に、メチルアルコール、エチルアルコール、n-プロピルアルコール、又はイソプロピルアルコール）、ケトン化合物（例えば、炭素原子2～4個の低級脂肪族ケトン；特に、メチルエチルケトン又はアセトン）、N、N-ジメチルホルムアミド、若しくはジオキサン、又はこれらの混合物を挙げることができ、分析対象物の種類に応じて適宜選択することができる。

【0022】本発明のイムノクロマトグラフ法においては、分析対象物に対して特異性を有する抗体（サンドウィッチ法では、抗原決定基が相互に異なる第1抗体及び第2抗体）として、特に限定されるものではないが、例えば、その分析対象物によって免疫された動物の血清から調製する抗血清、抗血清から精製された免疫グロブリン画分、その分析対象物によって免疫された動物の脾臓細胞を用いる細胞融合によって得られるモノクローナル抗体、あるいは、それらの断片【例えば、F(a b')<sub>2</sub>、F a b、F a b'、又はF v】を用いることができる。これらの抗体の調製は、常法により行なうことができる。

【0023】本発明のイムノクロマトグラフ法に使用す

ることのできるイムノクロマトグラフ用小片としては、通常のイムノクロマトグラフ法に用いることができるイムノクロマトグラフ用小片である限り、特に限定されるものではなく、例えば、図1に模式的に示すイムノクロマトグラフ用小片を用いることができる。図1に示すイムノクロマトグラフ用小片10は、展開方向（図1において矢印Aで示す方向）の上流から下流に向かって、試料添加パッド1、標識化物質保持パッド2、固定化メンブレン3、及び吸収パッド4がこの順に、粘着シート5上に配置されている。

【0024】前記固定化メンブレン3は、分析対象物と特異的に結合する抗体又は抗原を固定化した領域である検出ゾーン3aを有し、所望により、コントロール用抗体又は抗原を固定化した領域であるコントロールゾーン3bを更に有する。前記標識化物質保持パッド2は、標識化物質を含む懸濁液を調製し、その懸濁液を適当な吸収パッドに塗布した後、それを乾燥することにより調製することができる。また、前記試料添加パッド1は、例えば、適当な支持体（例えば、グラスファイバーパッド）を適当な溶液（例えば、0.5%ショ糖、0.2% Tween 20、及び0.1%ポリビニールアルコールを含む水溶液）に浸し、乾燥することにより調製することができる。

【0025】以下、本発明のイムノクロマトグラフ法について、その具体的な実施態様である抗体固定化競合法（抗体固定化直接的競合法及び抗体固定化間接的競合法を含む）、抗原固定化競合法（抗原固定化直接的競合法及び抗原固定化間接的競合法を含む）、サンドウィッチ法、及び固定抗原法にそれぞれ適用した各態様に基づいて、順に説明する。

【0026】本発明のイムノクロマトグラフ法を抗体固定化競合法に適用した態様（以下、単に、抗体固定化競合法と称する）では、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により分析対象物の分析を実施することができる。まず、分析対象物（抗原）に対して特異性を有する抗体を、先に述べた方法により予め調製しておき、その抗体を、適当な不溶性薄膜状支持体（例えば、ガラス繊維膜、ナイロン膜、又はセルロース膜等）上に固定しておく。また、標準化合物を、金属コロイド標識又は金属硫化物標識を用いて、予め標識化しておく。分析対象物（抗原）を含む可能性のある被検試料（又はその抽出液）と、前記標識化標準化合物とを展開させながら接触させ、それと同時に、あるいは、その終了後に、前記固定化抗体に、前記標識化標準化合物を展開させながら接触させると、その被検試料中に分析対象物が存在する場合には、抗原抗体反応が起きる。この抗原抗体反応は、通常の抗原抗体反応と同様に行なうことができる。

【0027】抗体固定化間接的競合法では、被検試料と既知量の標識化標準化合物（すなわち、標識化抗原）と

10

20

30

40

50



を接触させた後、前記固定化抗体と接触させる。従って、被検試料に由来する分析対象物と結合していない固定化抗体が、標識化標準化合物と結合する。一方、抗体固定化直接的競合法では、被検試料と既知量の標識化標準化合物（すなわち、標識化抗原）との接触と同時に、前記固定化抗体と接触させる。従って、既知量の標識化標準化合物と、被検試料に由来する未知量の分析対象物とが、拮抗的に固定化抗体と結合する。

【0028】抗体固定化競合法（抗体固定化直接的競合法及び抗体固定化間接的競合法を含む）では、前記不溶性薄膜状支持体上の固定化抗体と、標識化標準化合物（すなわち、標識化抗原）との反応が終了した後、固定化抗体と結合した標識化標準化合物と、固定化抗体と結合しなかった標識化標準化合物とを分離し、続いて、例えば、不溶性薄膜状支持体における固定化抗体を固定した領域に、金属イオン及び還元剤を滴下することにより、固定化抗体と結合した標識化抗原の標識からの信号を増幅する。あるいは、標識化標準化合物に金属イオン及び還元剤を添加し、同時に薄膜状支持体に添加することにより、固定化抗体と結合した標識化標準化合物の標識からの信号を増幅する。前記分離は、例えば、緩衝液による洗浄によって行なうことができる。

【0029】本発明のイムノクロマトグラフ法を抗原固定化競合法に適用した態様（以下、単に抗原固定化競合法と称する）では、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により分析対象物の分析を実施することができる。まず、分析対象物（抗原）に対して特異性を有する抗体を、先に述べた方法により予め調製しておく。また、前記抗体を、金属コロイド標識又は金属硫化物標識を用いて、予め標識化しておく。更に、既知量の標準化合物（抗原）を、適当な不溶性薄膜状支持体（例えば、ガラス繊維膜、ナイロン膜、又はセルロース膜等）上に固定しておく。

【0030】抗原固定化間接的競合法では、既知量の前記標識化抗体と、分析対象物（抗原）を含む可能性のある被検試料（又はその抽出液）との接触工程が終了してから、更に、既知量の固定化標準化合物（抗原）と接触させる。従って、被検試料に由来する分析対象物と結合していない標識化抗体が、不溶性薄膜状支持体の既知量の固定化標準化合物と結合する。一方、抗原固定化直接的競合法では、既知量の前記標識化抗体と、分析対象物（抗原）を含む可能性のある被検試料（又はその抽出液）との接触工程と同時に、既知量の固定化標準化合物（抗原）と接触させる。従って、被検試料に由来する未知量の分析対象物と、不溶性薄膜状支持体の既知量の固定化標準化合物とが、拮抗的に既知量の標識化抗体と結合する。

【0031】抗原固定化競合法（抗原固定化直接的競合法及び抗原固定化間接的競合法を含む）では、前記不溶性薄膜状支持体上の固定化標準化合物（すなわち、固定

化抗原）と、標識化抗体との反応が終了した後、固定化標準化合物と結合した標識化抗体と、固定化標準化合物と結合しなかった標識化抗体とを分離し、続いて、例えば、不溶性薄膜状支持体における固定化標準化合物を固定した領域に、金属イオン及び還元剤を滴下することにより、固定化標準化合物と結合した標識化抗体の標識からの信号を増幅する。あるいは、標識化抗体に金属イオン及び還元剤を添加し、同時に薄膜状支持体に添加することにより、固定化標準化合物と結合した標識化抗体の標識からの信号を増幅する。前記分離は、例えば、緩衝液による洗浄によって行なうことができる。

【0032】本発明のイムノクロマトグラフ法をサンドウィッチ法に適用した態様（以下、単に、サンドウィッチ法と称する）では、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により分析対象物の分析を実施することができる。まず、分析対象物（抗原）に対して特異性を有する第1抗体及び第2抗体を、先に述べた方法により予め調製しておく。また、第2抗体を、金属コロイド標識又は金属硫化物標識を用いて、予め標識化しておく。第1抗体を、適当な不溶性薄膜状支持体（例えば、ガラス繊維膜、ナイロン膜、又はセルロース膜等）上に固定し、分析対象物（抗原）を含む可能性のある被検試料（又はその抽出液）と接触させると、その被検試料中に分析対象物が存在する場合には、抗原抗体反応が起きる。この抗原抗体反応は、通常の抗原抗体反応と同様に行なうことができる。前記抗原抗体反応と同時に又は反応後に、過剰量の標識化第2抗体を更に接触させると、被検試料中に分析対象物が存在する場合には、固定化第1抗体と分析対象物（抗原）と標識化第2抗体とからなる免疫複合体が形成される。

【0033】サンドウィッチ法では、固定化第1抗体と分析対象物（抗原）と第2抗体との反応が終了した後、前記免疫複合体を形成しなかった標識化第2抗体を除去し、続いて、例えば、不溶性薄膜状支持体における固定化第1抗体を固定した領域に、金属イオン及び還元剤を滴下することにより、前記免疫複合体を形成した標識化第2抗体の標識からの信号を増幅する。あるいは、標識化第2抗体に金属イオン及び還元剤を添加し、同時に薄膜状支持体に添加することにより、前記免疫複合体を形成した標識化第2抗体の標識からの信号を増幅する。

【0034】本発明のイムノクロマトグラフ法を固定抗原法に適用した態様（以下、単に、固定抗原法と称する）では、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により分析対象物の分析を実施することができる。まず、分析対象物（抗体）に対して特異性を有する第2抗体を、先に述べた方法により予め調製しておく。また、前記第2抗体を、金属コロイド標識又は金属硫化物標識を用いて、予め標識化しておく。分析対象物（抗体）が特異的に結合する抗原を、適当な不溶性薄膜状支持体（例えば、ガラス繊維膜、ナイロン膜、又はセルロ

ース膜等)上に固定し、分析対象物(抗体)を含む可能性のある被検試料(又はその抽出液)と接触させると、その被検試料中に分析対象物が存在する場合には、抗原抗体反応が起きる。この抗原抗体反応は、通常の抗原抗体反応と同様に行なうことができる。前記抗原抗体反応と同時に又は反応後に、過剰量の標識化第2抗体を更に接触させると、被検試料中に分析対象物が存在する場合には、固定化抗原と分析対象物(抗体)と標識化第2抗体とからなる免疫複合体が形成される。

【0035】固定抗原法では、固定化抗原と分析対象物(抗体)と第2抗体との反応が終了した後、前記免疫複合体を形成しなかった標識化第2抗体を除去し、続いて、例えば、不溶性薄膜状支持体における固定化抗原を固定した領域に、金属イオン及び還元剤を滴下することにより、前記免疫複合体を形成した標識化第2抗体の標識からの信号を増幅する。あるいは、標識化第2抗体に金属イオン及び還元剤を添加し、同時に薄膜状支持体に添加することにより、前記免疫複合体を形成した標識化第2抗体の標識からの信号を増幅する。

【0036】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】《金コロイド標識抗体の銀増感》

(1)抗体固定化メンブレンの作製

ナイロン66製メンブレン(Immunodyne ABC;孔径=3.0 $\mu$ m;Pall Corporation製)を5mm $\times$ 25mmのサイズに切断した。メンブレンの一端から15mmの位置に、ウサギ抗マウスイムノグロブリン(Ig)抗体(DAKO製)[濃度1mg/mL;5mmol/Lホウ酸緩衝液(pH8.5)で希釈後、透析した溶液]を幅1mmの直線状に塗布した後、室温下で1時間、続いて、37℃で30分間静置し、抗体を固定化した。メンブレンを、0.5%モノエタノールアミンを含む100mmol/Lホウ酸塩緩衝生理食塩液(pH8.5)に浸し、室温下で30分間静置し、ブロッキングした。更に、メンブレンを、0.5%カゼインを含む100mmol/Lマレイン酸緩衝生理食塩液(pH7.5)に浸し、室温下で30分間静置し、更にブロッキングした。メンブレンを生理食塩液で1回、蒸留水で3回洗浄し、過剰のブロッキング液を除いた後、シリカゲルデシケータ内に保存し、室温下で一夜乾燥させ、イムノクロマトグラフ用抗体固定化メンブレン(以下、単に抗体固定化メンブレンと称する)とした。

【0037】(2)金コロイド標識マウスIgG懸濁液の調製

マウスIgG水溶液(濃度1mg/mL)1mLを、2mmol/L-Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>緩衝液[以下、ボラックス(Borax)緩衝液と称する](pH9.2)3.0

00mL中で4℃にて一夜透析した。マウスIgG水溶液を、4℃にて100,000 $\times$ gで1時間遠心分離した後、その上清を、100,000 $\times$ gで1時間遠心分離したボラックス緩衝液(pH9.2)で、マウスIgG濃度が100 $\mu$ g/mLとなるように希釈した。

【0038】一方、金コロイド液(GOLD COLLOID 20;British BioCell International製)100mLを、0.2mol/L-K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液でpH9.0に調整した。pH調整後の金コロイド液20mLを攪拌しながら、マウスIgG希釈液2mLを徐々に滴下し、室温下で30分間攪拌した。更に、攪拌しながら10%牛血清アルブミン(A-7888;Sigma製;以下、BSAと称する)溶液(pH9.2;4℃にて100,000 $\times$ gで1時間遠心分離した上清)2.5mLを徐々に滴下した後、室温下で30分間攪拌した。この溶液に5%ショ糖と0.2%Tween20を含む水溶液(0.45 $\mu$ mフィルター濾液)2.5mLを加え、混和した後、10℃にて16,000 $\times$ gで1時間遠心分離し、上清を除去した。

【0039】沈殿した金コロイド標識マウスIgGを、0.5%ショ糖及び0.02%Tween20を含むボラックス緩衝液(pH8.0;0.45 $\mu$ mフィルター濾液)20mLに再懸濁し、10℃にて16,000 $\times$ gで1時間遠心分離し、上清を除去した。更に、沈殿した金コロイド標識マウスIgGを、0.5%ショ糖及び0.02%Tween20を含むボラックス緩衝液(pH8.0)20mLに再懸濁し、10℃にて16,000 $\times$ gで1時間遠心分離し、上清を除去した。最後に、沈殿した金コロイド標識マウスIgGを、0.5%ショ糖及び0.02%Tween20を含むボラックス緩衝液(pH8.0)に再懸濁した後、粒子密度が約10<sup>13</sup>/mL(波長520nmにおける吸光度=約14)になるように濃度調整し、表面をシリコン処理したガラス試験管に移し、密栓して4℃に保存し、イムノクロマトグラフ用金コロイド標識マウスIgG(以下、金コロイド抗体と称する)懸濁液とした。

【0040】(3)金コロイド抗体保持パッドの作製  
前記実施例1(2)で調製した金コロイド抗体懸濁液を、金コロイド粒子密度が約3 $\times$ 10<sup>12</sup>/mL、約10<sup>12</sup>/mL、約3 $\times$ 10<sup>11</sup>/mL、約10<sup>11</sup>/mL、約3 $\times$ 10<sup>10</sup>/mL、約10<sup>10</sup>/mL、約3 $\times$ 10<sup>9</sup>/mL、約10<sup>9</sup>/mL、約3 $\times$ 10<sup>8</sup>/mL、約10<sup>8</sup>/mL、約3 $\times$ 10<sup>7</sup>/mL、約10<sup>7</sup>/mL、約3 $\times$ 10<sup>6</sup>/mL、又は約10<sup>6</sup>/mLになるように、5.0%ショ糖を含む5mmol/Lリン酸塩緩衝液(pH7.2)で希釈した後、各希釈液10 $\mu$ Lを吸収パッドPR EM1420(5mm $\times$ 5mm;Pall Corporation製)に塗布し、シリカゲルデシケータ内で室温下、一夜減圧( $\leq$ 100mmHg)乾燥して、イ

ムノクロマトグラフ用金コロイド抗体保持パッド（以下、金コロイド抗体保持パッドと称する）を調製した。

【0041】（4）試料添加パッドの作製

グラスファイバーパッド（5mm×18mm）を0.5%ショ糖、0.2%Tween20、及び0.1%ポリビニールアルコール（重合度＝約500）を含む水溶液に浸した後、過剰の水溶液を除去し、風乾して、イムノクロマトグラフ用試料添加パッド（以下、試料添加パッドと称する）を調製した。

【0042】（5）吸収パッドの作製

セルロースパッド（AP15；Millipore Coaporation製）を、5mm×20mmのサイズに切断し、イムノクロマトグラフ用吸収パッド（以下、吸収パッドと称する）とした。

【0043】（6）金コロイド抗体イムノクロマトグラフ小片の作製

5mm×60mmのサイズに切断したプラスチック粘着シート（BioDot製）に、展開方向に関して上流側から下流側に向かって、前記実施例1（4）で調製した試料添加パッド、前記実施例1（3）で調製した金コロイド抗体保持パッド、前記実施例1（1）で調製した抗体固定化メンブレン、及び前記実施例1（5）で調製した吸収パッドの順に、各々その両端を隣接する部材と1mm重ね合わせて貼付し、金コロイド抗体イムノクロマトグラフ小片とした。

【0044】（7）金コロイド抗体イムノクロマトグラフ小片の検出感度の評価

異なった粒子密度の金コロイド抗体を一定量保持した、前記実施例1（6）で調製した金コロイド抗体イムノクロマトグラフ小片（金コロイドの各粒子密度につき、2本ずつ）を水平に静置し、各々の試料添加パッドに、0.5%ショ糖、0.5%BSA、及び0.2%Tween20を含む100mmol/Lリン酸塩緩衝生理食塩液（以下、移動相緩衝液と称する）50μLを滴下し、室温下で10分間展開した。2本の内、一方の金コロイド抗体イムノクロマトグラフ小片におけるメンブレン上のウサギ抗マウスIg抗体を固定化した部分（以下、検出ゾーンと称する）の金コロイド標識抗体の捕捉に基づく赤紫～紫色の着色の有無を目視判定した。また、残るもう一方の金コロイド抗体イムノクロマトグラ

フ小片における検出ゾーン上に、銀増感液〔Silver Enhancing Kit（Cat. SEKB250）；British BioCell International製〕20μLを滴下し、室温下で10分間静置した後、金コロイド抗体の捕捉及び銀増感に基づく褐色の着色の有無を判定した。更に、そのままの状態で30分間静置した後、金コロイド抗体の捕捉及び銀増感に基づく褐色の着色の有無を判定した。

【0045】結果を表1に示す。表1において、「銀増感法①」は、銀増感液滴下後、10分間放置した後の結果を示し、「銀増感法②」は、銀増感液滴下後、40分間放置した後の結果を示す。表1において、「+++」は、検出ゾーンの着色が充分に確認することができることを意味し、「++」は、検出ゾーンの着色が、前記「+++」よりもわずかに薄い、充分に着色を確認することができることを意味し、「+」は、検出ゾーンの着色が、前記「+++」よりもかなり薄い、充分に着色を確認することができることを意味し、「±」は、検出ゾーンの着色が、前記「+++」よりも相当に薄く、ごくわずかに着色を確認することができることを意味し、「-」は、検出ゾーンの着色が確認されないことを意味する。

【0046】金コロイド抗体の捕捉に基づく赤紫～紫色の着色の場合、金コロイド粒子密度が約 $10^{10}$ /mL（粒子数＝ $10^6$ ）まで検出ゾーンの着色を確認することができたに留まった。それに対して、金コロイド抗体の捕捉及び銀増感に基づく褐色の着色の場合、10分間静置した後でも、金コロイド粒子密度が約 $10^8$ /mL（粒子数＝ $10^6$ ）まで検出ゾーンの着色を確認することができ、金コロイド抗体の捕捉に基づく赤紫～紫色の着色のみの場合と比較して1/100の粒子密度まで検出することができた。また、更に30分間静置した後では、金コロイド粒子密度が約 $10^7$ /mL（粒子数＝ $10^6$ ）まで検出ゾーンの着色を確認することができ、金コロイド抗体の捕捉に基づく赤紫～紫色の着色のみの場合と比較して1/1000の粒子密度まで検出することができた。

【0047】

【表1】

金コロイド粒子密度 (個/mL)	検出ゾーンの着色度		
	金コロイド目視法	銀増感法①	銀増感法②
$3 \times 10^{12}$	+++	+++	+++
$10^{12}$	++	++	+++
$3 \times 10^{11}$	+	++	++
$10^{11}$	+	++	++
$3 \times 10^{10}$	±	++	++
$10^{10}$	±	++	++
$3 \times 10^9$	—	+	++
$10^9$	—	+	++
$3 \times 10^8$		±	+
$10^8$		±	+
$3 \times 10^7$		—	±
$10^7$		—	±
$3 \times 10^6$			—
$10^6$			—
0 (希釈液)	—	—	—

【0048】

【実施例2】《サンドウィッチイムノクロマトグラフ法によるラクトフェリンの測定》

(1) ラクトフェリンのサンドウィッチイムノクロマトグラフ法用メンブレンの作製

メンブレンの一端から15mmの位置に塗布したウサギ抗マウスイムノグロブリン抗体に加え、更に、メンブレンの一端から10mmの位置に、マウスモノクローナル抗ラクトフェリン抗体17B04-08〔濃度1mg/mL；5mmol/Lホウ酸緩衝液(pH8.5)で希釈後、透析した溶液〕を幅1mmの直線状に塗布したこと以外は、前記実施例1(1)の操作を繰り返すことにより、ラクトフェリンのサンドウィッチイムノクロマトグラフ法用メンブレン(以下、17B04-08メンブレンと称する)を調製した。なお、前記マウスモノクローナル抗ラクトフェリン抗体17B04-08は、ヒトラクトフェリン(Sigma LO520)を免疫原として、常法によりマウスを免疫して調製した。

【0049】(2) 金コロイド標識マウスモノクローナル抗ラクトフェリン抗体懸濁液の調製

マウスIgGの代わりに、前記実施例2(1)で使した17B04-08抗体とラクトフェリン分子に対する結合部位の異なるマウスモノクローナル抗ラクトフェリン抗体32D01-10を用いたこと以外は、前記実施例1(2)の操作を繰り返すことにより、ラクトフェリンのイムノクロマトグラフ法用金コロイド標識抗体(以下、32D01-10金コロイドと称する)懸濁液を調製した。なお、前記マウスモノクローナル抗ラクトフェリン抗体32D01-10は、ヒトラクトフェリン(Sigma LO520)を免疫原として、常法によりマウスを免疫して調製した。

20 【0050】(3) イムノクロマトグラフ用金コロイド抗体保持パッドの作製

前記実施例2(2)で調製した32D01-10金コロイド懸濁液を、金コロイド粒子密度が約 $2.1 \times 10^{12}$ /mL(波長520nmにおける吸光度=約3.0)になるように、5.0%ショ糖を含む5mmol/Lリン酸塩緩衝液(pH7.2)で希釈した後、得られた希釈液10μLを吸収パッドPREM1420(5mm×5mm；Pall Corporation製)に塗布し、シリカゲルデシケーター内で室温下、一夜減圧(≤100mmHg)乾燥して、イムノクロマトグラフ用金コロイド抗体保持パッド(以下、32D01-10金コロイド保持パッドと称する)を調製した。

30 【0051】(4) ラクトフェリンのサンドウィッチイムノクロマトグラフ小片の作製

5mm×60mmのサイズに切断したプラスチック粘着シート(BioDot製)に、展開方向に関して上流側から下流側に向かって、前記実施例1(4)で調製した試料添加パッド、前記実施例2(3)で調製した32D01-10金コロイド保持パッド、前記実施例2

40 (1)で調製した17B04-08メンブレン、及び前記実施例1(5)で調製した吸収パッドの順に、各々その両端を隣接する部材と1mm重ね合わせて貼付し、ラクトフェリンのサンドウィッチイムノクロマトグラフ小片を調製した。

【0052】(5) ラクトフェリンのサンドウィッチイムノクロマトグラフ小片の検出感度の評価

前記実施例2(4)で調製したラクトフェリンのサンドウィッチイムノクロマトグラフ小片を水平に静置し、各々の試料添加パッドに、前記移動相緩衝液に溶解したラクトフェリン標準溶液(濃度=0.1ng/mL、0.

2 ng/mL、0.3 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、3.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、30 ng/mL、50 ng/mL、及び100 ng/mL) 50  $\mu$ Lを滴下し、室温下で10分間展開した。ラクトフェリンのサンドウィッチイムノクロマトグラフ小片における17B04-08メンブレン上の17B04-08抗体を固定化した部分（すなわち、検出ゾーン）の32D01-10金コロイドの捕捉に基づく赤紫～紫色の着色の有無を目視観察し、ラクトフェリン標準溶液の最少検出濃度を判定した（検出ゾーンにわずかも赤紫～紫色の着色が認められたラクトフェリン標準溶液の濃度を最少検出濃度とした）。

【0053】続いて、直ちに各々のラクトフェリンのサンドウィッチイムノクロマトグラフ小片における前記検出ゾーン上に、銀増感液50  $\mu$ Lを滴下し、室温下で10分間静置した後、32D01-10金コロイドの捕捉及び金コロイドの銀増感に基づく褐色の着色の有無を目視観察し、ラクトフェリン標準溶液の最少検出濃度を判定した（検出ゾーンにわずかも褐色の着色が認められたラクトフェリン標準溶液の濃度を最少検出濃度とした）。

【0054】結果を表2に示す。表2において、「+」\*

\*は、検出ゾーンの着色が、コントロールゾーン（ラクトフェリンのサンドウィッチイムノクロマトグラフ小片における17B04-08メンブレン上のウサギ抗マウスイムノグロブリン抗体を固定化した部分）の着色と同程度に濃い、あるいは、薄くても、着色が十分に目視判定ができる程度であることを意味し、「±」は、検出ゾーンの着色が、コントロールゾーンと比較してかなり薄く、ごくわずかな着色が目視判定することができる程度であることを意味し、「-」は、コントロールゾーンの着色は認められるが、検出ゾーンの着色が目視判定することができないことを意味する。

【0055】32D01-10金コロイドの捕捉に基づく赤紫～紫色の着色の場合、ラクトフェリン標準溶液の濃度が20 ng/mLまで検出ゾーンの着色を確認することができた。それに対して、32D01-10金コロイドの捕捉及び金コロイドの銀増感に基づく褐色の着色の場合、ラクトフェリン標準溶液の濃度が1.0 ng/mLまで検出ゾーンの着色を確認することができ、32D01-10金コロイドの補足に基づく赤紫～紫色の着色のみの場合と比較して1/20の濃度のラクトフェリン標準溶液まで検出することができた。

【0056】

【表2】

ラクトフェリン標準溶液濃度 (ng/mL)	検出ゾーンの着色度	
	金コロイド目視法	銀増感法
100	+	+
50	+	+
30	+	+
20	±	+
10	-	+
5.0	-	+
3.0	-	+
2.0	-	+
1.0	-	±
0.5		-
0.3		-
0.2		-
0.1		-
0 (希釈液)	-	-

【0057】

【実施例3】《抗原固定化直接競合イムノクロマトグラフ法によるラクトフェリンの測定》

(1) ラクトフェリンの直接競合イムノクロマトグラフ法用メンブレンの作製

マウスモノクローナル抗ラクトフェリン抗体（17B04-08抗体）の代わりに、ヒトラクトフェリン（Sigma製：以下、Lfと称することがある）を用いたこ

と以外は、前記実施例2(1)の操作を繰り返すことにより、ラクトフェリンの直接競合イムノクロマトグラフ法用メンブレン（以下、Lfメンブレンと称する）を調製した。

【0058】(2) 金コロイド抗体保持パッドの作製  
前記実施例2(2)で調製した32D01-10金コロイド懸濁液を、金コロイド粒子密度が約 $1.4 \times 10^{12}$  /mL（波長520 nmにおける吸光度=約2.0）又

は約 $7 \times 10^{10}$ /mL (波長520nmにおける吸光度=約0.1)になるように、5.0%ショ糖を含む5mmol/Lリン酸塩緩衝液(pH7.2)で希釈した後、得られた希釈液5 $\mu$ Lを吸収パッドPREM1420(5mm $\times$ 5mm; Pall Corporation製)に塗布し、シリカゲルデシケーター内で室温下、一夜減圧( $\leq 100$ mmHg)乾燥して、ラクトフェリンのイムノクロマトグラフ用金コロイド抗体保持パッドを調製した。以下、金コロイド粒子密度が約 $1.4 \times 10^{12}$ /mLである希釈液を塗布した前記保持パッドを金コロイド目視判定用保持パッドと称する。また、金コロイド粒子密度が約 $7 \times 10^{10}$ /mLである希釈液を塗布した前記保持パッドを金コロイド銀増感用保持パッドと称する。

#### 【0059】(3)ラクトフェリンの直接競合イムノクロマトグラフ小片の作製

5mm $\times$ 60mmのサイズに切断したプラスチック粘着シート(BioDot製)に、展開方向に関して上流側から下流側に向かって、前記実施例1(4)で調製した試料添加パッド、前記実施例3(2)で調製した金コロイド目視判定用保持パッド、前記実施例3(1)で調製したLfメンブレン、及び前記実施例1(5)で調製した吸収パッドの順に、各々その両端を隣接する部材と1mm重ね合わせて貼付し、ラクトフェリンの金コロイド目視判定用イムノクロマトグラフ小片を調製した。また、5mm $\times$ 60mmのサイズに切断したプラスチック粘着シート(BioDot製)に、展開方向に関して上流側から下流側に向かって、前記実施例1(4)で調製した試料添加パッド、前記実施例3(2)で調製した金コロイド銀増感用保持パッド、前記実施例3(1)で調製したLfメンブレン、及び前記実施例1(5)で調製した吸収パッドの順に、各々その両端を隣接する部材と1mm重ね合わせて貼付し、ラクトフェリンの金コロイド銀増感用イムノクロマトグラフ小片を調製した。

#### 【0060】(4)ラクトフェリンの直接競合イムノクロマトグラフ小片の検出感度の評価

前記実施例3(3)で調製したラクトフェリンの金コロイド目視判定用イムノクロマトグラフ小片及びラクトフェリンの金コロイド銀増感用イムノクロマトグラフ小片を水平に静置し、各々の試料添加パッドに、前記移動相緩衝液に溶解したラクトフェリン標準溶液(濃度=0.

1ng/mL、0.2ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、及び100ng/mL)50 $\mu$ Lを滴下し、室温下で10分間展開した。ラクトフェリンの金コロイド目視判定用イムノクロマトグラフ小片におけるメンブレン上のラクトフェリンを固定化した部分(すなわち、検出ゾーン)の32D01-10金コロイドの捕捉に基づく赤紫～紫色の着色の有無を目視観察し、ラクトフェリン標準溶液の最少検出濃度を判定した(検出ゾーンの赤紫～紫色の着色が完全に消失したラクトフェリン標準溶液の濃度を最少検出濃度とした)。

【0061】一方、金コロイド銀増感用イムノクロマトグラフ小片におけるメンブレン上の検出ゾーン上には、金コロイドの前記展開後、直ちに銀増感液50 $\mu$ Lを滴下し、室温下で10分間静置した後、32D01-10金コロイドの捕捉及び金コロイドの銀増感に基づく褐色の着色の有無を目視観察し、ラクトフェリン標準溶液の最少検出濃度を判定した(検出ゾーンの褐色の着色が完全に消失したラクトフェリン標準溶液の濃度を最少検出濃度とした)。

【0062】結果を表3に示す。表3において、「+」は、コントロールゾーンの着色は認められるが、検出ゾーンの着色が目視判定することができないことを意味し、「±」は、コントロールゾーンの着色は認められるが、検出ゾーンの着色の度合いがごくわずかであることを意味し、「-」は、検出ゾーン及びコントロールゾーンの両方で、着色が目視で判定することができることを意味する。

【0063】32D01-10金コロイドの捕捉に基づく赤紫～紫色の着色の場合、ラクトフェリン標準溶液の濃度が50ng/mLまで検出ゾーンの着色の消失を確認することができた。それに対して、32D01-10金コロイドの捕捉及び金コロイドの銀増感に基づく褐色の着色の場合、ラクトフェリン標準溶液の濃度が5ng/mLまで検出ゾーンの着色の消失を確認することができ、32D01-10金コロイドの補足に基づく赤紫～紫色の着色のみの場合と比較して1/10の濃度のラクトフェリン標準溶液まで検出することができた。

【0064】

【表3】

ラクトフェリン標準溶液濃度 (ng/mL)	検出ゾーンの着色度	
	金コロイド目視法	銀増感法
100	+	+
50	+	+
20	—	+
10	—	+
5.0	—	±
2.0	—	—
1.0	—	—
0.5	—	—
0.2	—	—
0.1	—	—
0 (希釈液)	—	—

【0065】

【実施例4】《抗原固定化直接競合イムノクロマトグラフ法によるオカダ酸の測定》

(1) オカダ酸の直接競合イムノクロマトグラフ法用メンブレンの作製

ナイロン66製メンブレンを5mm×25mmのサイズに切断した。メンブレンの一端から10mmの位置に、エチレンジアミン溶液〔濃度10mg/mL; 5mmol/Lホウ酸緩衝液(pH8.5)で希釈した希釈溶液〕を幅1mmの直線状に塗布し、更に、メンブレンの一端から15mmの位置に、ウサギ抗マウスイムノグロブリン(1g)抗体(DAKO製)〔濃度1mg/mL; 5mmol/Lホウ酸緩衝液(pH8.5)で希釈後、透析した溶液〕を幅1mmの直線状に塗布した後、室温下で1時間、37℃で30分間静置した。メンブレンを、0.5%モノエタノールアミンを含む100mmol/Lホウ酸塩緩衝生理食塩液(pH8.5)に浸し、室温下で30分間振とうさせた後、蒸留水(0.45μmフィルターで濾過した蒸留水)で4回洗浄し、37℃で乾燥させた。

【0066】オカダ酸(和光純薬製; 以下、OAと称する)50μg、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩238μg、及びN-ヒドロキシスクシニミド71.5μgをN,N-ジメチルホルムアミド100μLに溶かし、室温下で1時間反応させた後、その約1μLを、前記メンブレン上のエチレンジアミン溶液を塗布した位置に、重ねて塗布した。室温下で1時間反応させ、更に37℃で10分間反応させた後、メンブレンを、0.5%モノエタノールアミンを含む100mmol/Lホウ酸塩緩衝生理食塩液(pH8.5)に浸し、室温下で30分間振とうした。更に、メンブレンを、0.5%カゼインを含む100mmol/Lマレイン酸緩衝生理食塩液(pH7.5)に浸し、室温下で30分間静置し、ブロッキングした。メ

ンブレンを、生理食塩液で1回、蒸留水で3回洗浄し、過剰のブロッキング液を除いた後、シリカゲルデシケータ内に保存し、室温下で一晩乾燥させ、オカダ酸の直接競合イムノクロマトグラフ法用メンブレン(以下、OAメンブレンと称する)を調製した。

【0067】(2) 金コロイド標識マウスモノクローナル抗オカダ酸抗体懸濁液の調製

マウスIgGの代わりに、マウスモノクローナル抗オカダ酸抗体958-2抗体を用いたこと以外は、前記実施例2(2)の操作を繰り返すことにより、オカダ酸のイムノクロマトグラフ法用金コロイド標識抗体(以下、958-2金コロイドと称する)懸濁液を調製した。なお、前記マウスモノクローナル抗オカダ酸抗体958-2抗体は、オカダ酸-ヒトイムノグロブリンG複合体を免疫原として、常法によりマウスを免疫して調製した。

【0068】(3) イムノクロマトグラフ法用金コロイド抗体保持パッドの作製

前記実施例4(2)で調製した958-2金コロイド懸濁液を、金コロイド粒子密度が約 $7.1 \times 10^{11}/\text{mL}$ (波長520nmにおける吸光度=約1.0)又は約 $1.4 \times 10^9/\text{mL}$ (波長520nmにおける吸光度=約0.002)になるように、5.0%ショ糖を含む5mmol/Lリン酸塩緩衝液(pH7.2)で希釈した後、得られた希釈液5μLを吸収パッドPREMI420に塗布し、シリカゲルデシケータ内で室温下、一夜減圧( $\leq 100\text{mmHg}$ )乾燥して、オカダ酸のイムノクロマトグラフ法用金コロイド抗体保持パッドを調製した。以下、金コロイド粒子密度が約 $7.1 \times 10^{11}/\text{mL}$ である希釈液を塗布した前記保持パッドを金コロイド目視判定用保持パッドと称する。また、金コロイド粒子密度が約 $1.4 \times 10^9/\text{mL}$ である希釈液を塗布した前記保持パッドを金コロイド銀増感用保持パッドと称する。

【0069】(4) オカダ酸の直接競合イムノクロマト



## グラフ小片の作製

5mm×60mmのサイズに切断したプラスチック粘着シート（BioDot製）に、展開方向に関して上流側から下流側に向かって、前記実施例1（4）で調製した試料添加パッド、前記実施例4（3）で調製した金コロイド目視判定用保持パッド、前記実施例4（1）で調製したOAメンブレン、前記実施例1（5）で調製した吸収パッドの順に、各々その両端を隣接する部材と1mm重ね合わせて貼付し、オカダ酸の金コロイド目視判定用イムノクロマトグラフ小片を調製した。また、5mm

×60mmのサイズに切断したプラスチック粘着シート（BioDot製）に、展開方向に関して上流側から下流側に向かって、前記実施例1（4）で調製した試料添加パッド、前記実施例4（3）で調製した金コロイド銀増感用保持パッド、前記実施例4（1）で調製したOAメンブレン、前記実施例1（5）で調製した吸収パッドの順に、各々その両端を隣接する部材と1mm重ね合わせて貼付し、オカダ酸の金コロイド銀増感用イムノクロマトグラフ小片を調製した。

【0070】（5）オカダ酸の直接競合イムノクロマトグラフ小片の検出感度の評価  
前記実施例4（4）で調製したオカダ酸の金コロイド目視判定用イムノクロマトグラフ小片及びオカダ酸の金コロイド銀増感用イムノクロマトグラフ小片を水平に静置し、各々の試料添加パッドに、前記移動相緩衝液に溶解したオカダ酸標準溶液（濃度＝1.0ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、500ng/mL、及び1.0μg/mL）50μLを滴下し、室温下で10分間展開した。\*30

\*オカダ酸の金コロイド目視判定用イムノクロマトグラフ小片上におけるメンブレン上のOAを固定化した部分（すなわち、検出ゾーン）の958-2金コロイドの捕捉に基づく赤紫～紫色の着色の有無を目視観察し、オカダ酸標準溶液の最少検出濃度を判定した（検出ゾーンの赤紫～紫色の着色が完全に消失したオカダ酸標準溶液の濃度を最少検出濃度とした）。

【0071】一方、金コロイド銀増感用イムノクロマトグラフ小片上におけるメンブレン上の検出ゾーン上には、金コロイドの前記展開後、直ちに銀増感液50μLを滴下し、室温下で30分間静置した後、958-2金コロイドの捕捉及び金コロイドの銀増感に基づく褐色の着色の有無を目視観察し、オカダ酸標準溶液の最少検出濃度を判定した（検出ゾーンの褐色の着色が完全に消失したオカダ酸標準溶液の濃度を最少検出濃度とした）。

【0072】結果を表4に示す。表4における「+」、「±」、及び「-」は、表3と同じ意味である。958-2金コロイドの捕捉に基づく赤紫～紫色の着色の場合、オカダ酸標準溶液の濃度が200ng/mLまで検出ゾーンの着色の消失を確認することができたに留まった。それに対して、958-2金コロイドの捕捉及び金コロイドの銀増感に基づく褐色の着色の場合、オカダ酸標準溶液の濃度が10ng/mLまで検出ゾーンの着色の消失を確認することができ、958-2金コロイドの補足に基づく赤紫～紫色の着色のみの場合と比較して1/20の濃度のオカダ酸標準溶液まで検出することができた。

【0073】

【表4】

オカダ酸標準溶液濃度 (ng/mL)	検出ゾーンの着色度	
	金コロイド目視法	銀増感法
1000	+	+
500	+	+
200	+	+
100	-	+
50	-	+
20	-	+
10	-	+
5.0		-
2.0		-
1.0		-
0（希釈液）	-	-

【0074】

【発明の効果】本発明のイムノクロマトグラフ法によれば、迅速且つ簡便に、しかも、従来公知のイムノクロマトグラフ法よりも更に高感度に、被検試料中の分析対象

物を分析することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のイムノクロマトグラフ法に使用することのできるイムノクロマトグラフ用小片の一態様を模式

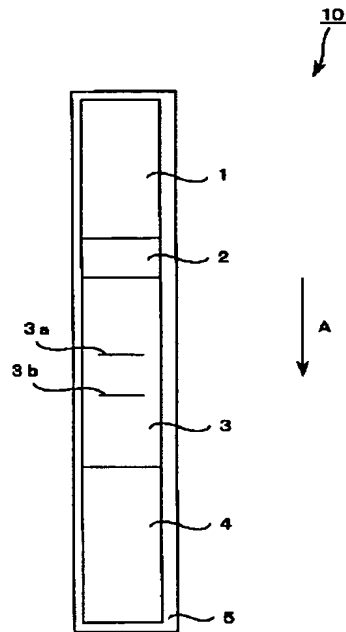
的に示す平面図である。

【符号の説明】

1・・・試料添加パッド；2・・・標識化物質保持パッド；

＊ド；3・・・固定化メンブレン；4・・・吸収パッド；  
5・・・粘着シート；10・・・免疫クロマトグラフ  
用小片。

【図1】



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**